

CAROLINA RIBEIRO CÓRDULA

**HEPARINASES: CLONAGEM, EXPRESSÃO E REQUISITOS
ESTRUTURAIS PARA A ATIVIDADE.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2011

CAROLINA RIBEIRO CÓRDULA

**HEPARINASES: CLONAGEM, EXPRESSÃO E REQUISITOS
ESTRUTURAIS PARA A ATIVIDADE.**

Tese preparada no Departamento de Bioquímica durante o Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Bonciani Nader

Co-Orientador: Prof. Dr. Ivarne Luís dos Santos Tersariol

São Paulo

2011

Córdula, Carolina Ribeiro

Heparinases: Clonagem, Expressão e Requisitos Estruturais para a Atividade.

/Carolina Ribeiro Córdula --São Paulo, 2011.

195f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo.
Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular.

Título em inglês: **Heparinases: Cloning, Expression
and Structural Requirements for Activity.**

1. heparinase 2. heparina 3. enzima 4. clonagem

Tese preparada no Departamento de Bioquímica durante o Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular e apresentada à Universidade Federal de São Paulo–Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Helena Bonciani Nader

Co-orientador: Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

À minha mãe, Diana Carolina, pelo maior amor que eu poderia receber e sentir, além dos ensinamentos, paciência, e por suportar tanta saudade. A meu pai, Raul Córdula, pelo amor, carinho, doçura e companheirismo. Tenho orgulho de ser de vocês.

A minha Vó Zezé, por todo amor! Sei que ela está
sempre ao meu lado!

Aos meus orientadores, Dra. Helena Bonciani Nader e Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, por me proporcionarem uma excelente formação, com direito a experimentar pesquisa de alta qualidade, ensino constante e extensão do conhecimento para a comunidade, contribuindo para um país melhor. Ao Prof. Dr. Carl Peter von Dietrich, pelo legado científico que deixou para nosso laboratório e para a humanidade.

Ao meu padrinho Sinval, por está sempre presente,
como pai que também meu é, com amor, carinho e
muitos conselhos.

À Marco Aurélio (chuchu), com muito amor.

Agradecimentos

À toda **minha família**, que sempre torceu por mim, em especial à **Tia Jane** (saúde), **Titio Alexandre**, **Tia Kátia**, **Cris**, **Tatá**, **Yacy**, **Moara**, **Hoton**, **Diego**, **Cacau**, **Amelinha**, **Jujú**, **Lulú**, **Diogo** e minha madrinha **Marisa**.

À **Profa. Dra. Leny Toma**, por sua dedicação, adoção, conhecimento, carinho, entusiasmo, estímulo e doçura.

À **Profa. Dra. Yara M. Michelacci** pela grande professora e pesquisadora que é. A melhor aula de biologia molecular que já tive!

À **Profa. Dra. Marimélia Porcionatto**, por tudo que vivemos em Tabatinga e em nossos projetos de educação. Seu estilo de vida, sempre saudável e esportista, é uma inspiração.

À **Professora Giselly**, pelo carinho com todos e dedicação à pesquisa!

À **Profa. Dra. Carla Lopes**, pela alegria constante, descontração e amizade!

À **Profa. Dra. Maria Aparecida Pinhal (Cida)** pelos momentos de muita alegria e descontração.

À **Aline Mendes**, minha maior amiga paulista, por tudo!! Tudo mesmo! Ouvir, me agüentar, me alimentar, me ajudar em experimentos, me levar pra passear....pelas viagens, conversas, considerações, por ser minha amiga de verdade! Te amo!

À querida **Elsa Yoko Kobayashi**, sem palavras para descrever minha gratidão com tanta ajuda recebida e tantas risadas, além de resolver qualquer problema que possa acontecer, como acidentes químicos.... Sem ela não há Biologia Molecular. Simples assim, né moçada! E ao **Dr. João Martins**, “nosso médico partícular”, pela amizade e conversas sempre alegres nos momentos dos experimentos.

À **Isabel das Neves**, por ser uma querida amiga desde o primeiro dia que cheguei. Nunca esqueci isso!

À **Patrícia e Clélia**, as secretárias mais lindas e carinhosas, meu primeiro abraço gostoso do dia ao entrar no laboratório. Patinha sempre resolvendo nossos problemas e toda agoniada; Clélia sempre carinhosa e manhosa. Amo as duas!

À **Luciana**, por ser tão prestativa e atenciosa.

Aos amigos **Dr. Roberto Sallai**, pelo carinho e muitos trabalhos de educação realizados juntos com amor, além de sua incrível criatividade para montar aulas inovadoras e divertidas para crianças. À amiga **Dra. Juliana Dreyfuss**, por tudo que aprendemos juntas em nossas experiências em educação pelo Brasil afora.

À irmã e amiga **Dra. Valquíria Medeiros**, por ser minha companheira de apartamento esses anos todos e por tudo que passamos juntas, resolvendo chuveiro quebrado, pagando contas, negociando valor de aluguel e nos divertindo acima de tudo! Obrigada Val!

À minha doce amiga **Carolina Meloni**, por ser a menina mais meiga e por nossas viagens inesquecíveis, como ver a neve pela primeira vez! Amo muito você quéro!

Aos amigos **Tarsis, Gioconda, Guilherme** (magrinho), **Rafael** (mamão), **Renata Aquino, Dr. Edgar Julian, Renan, Sheila, Dayse, Marcelo, Gabriel, Duda, Dra. Eloah, Thèresè, Dra. Thaís da Dra. Yara; Dra. Cilene; Dr. Jair, Thaís Aguilar, Ana Carolina, Marcelly, Cesinha e Lu Pap**, pela amizade e pelo convívio sempre alegre. Foram 7 anos intensos nos vendo todos os dias.

Aos amigos do quinto andar (Bioquímica), para onde eu sempre corri quando precisei de ajuda nos experimento, em especial à **Maire**, sempre muito prestativa, **Diegão, Dra. Cida Tanaka, Ricardo, Renan, Tati, Dra. Guaciara, Dr. Marlon, Nathália, Mariana e Dra. Maria Luíza**.

Ao meu querido amigo **Dr. Rodrigo Ippolito** (Rô), pela amizade e doçura, carinhoso desde o dia que cheguei no lab.

Aos amigos do segundo andar (Biofísica), pela ajuda nos experimentos e amizade, em especial ao **Prof. Dr. Vítor, Marcelo, Dr. Yuri**.

Ao **Prof. Zé Olavo**, pelo curso mais intensivo e instigante de Bioquímica e pela doçura e amizade. Um poço de conhecimento.

Ao meu aluno de IC **Daniel** (Déniel) pela oportunidade de “orientar” um dos melhores e mais dedicados alunos, sempre pronto a ajudar e com uma postura segura em relação ao mundo. Te adoro Déniel, você é o orgulho meu e de Aline!

Aos amigos, **Tábata, Rit, Marcelo, Thaís Jarouge, Romine, Carol Ariza, Ana Paula, Clarice Japinha**, que em algum momento convivemos na corrida rumo

à tese, pela constante amizade e momentos de alegria no trabalho, nos congressos, ...

Aos amigos da Associação do Pós-graduandos (APG), **Tato, Cazuza, Vanessa, Márcio, Juca**, por grandes momentos de conversas e discussões sobre a pós-graduação na Unifesp e no Brasil, além da luta pelo coletivo, sempre!

À grande oportunidade de participar de projetos tão maravilhosos como o Papem e as oficinas da SBPC; pela SBPC e pela educação e extensão fazer parte da minha formação em pesquisa! Obrigada **Dra. Helena Nader!!**

Aos amigos **Viviane, Douglas, Paola** (Merck), pela amizade e carinho sempre, atenciosos e queridos amigos que irão ficar para a vida toda. À todos os representantes que convivem conosco, procurando sempre facilitar nosso trabalho, em especial **João Paulo, Washington, Geraldo e Ana Lúcia**.

A todos os amigos e colegas da Biologia Molecular, pela convivência e aprendizado.

À **dona Ju** (saúde), **Vera, Patrícia e Fran**, sempre cuidando de todos nós, com café e chá quentinhos, comidinhas, abraços e carinhos.

Às secretárias Ana e Márcia, pela amizade e carinho!

Ao **Sr. Ademar**, pela simpatia e cuidado com que nos trata e trabalha.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	1
1. Glicosaminoglicanos	1
2. Distribuição, função biológica e atividade farmacológica de glicosaminoglicanos	6
3. Tipos de Glicosaminoglicanos.....	9
3.1. Ácido Hialurônico	9
3.2. Condroitim Sulfato	11
3.3. Dermatan Sulfato	12
3.4. Queratan Sulfato	13
3.5. Heparan Sulfato.....	14
3.6. Heparina.....	17
3.6.1. Histórico.....	17
3.6.2. Características Estruturais.....	19
3.6.3. Heparina e Hemostasia	20
3.6.4. Heparina de baixo peso molecular (LMWH).....	26
3.6.5. Heparina e OSCS.....	28
4. Degradação da Heparina e Heparan sulfato	30
4.1. Eucariotos.....	30
4.2. Procariotos	32
5. Heparinase.....	42
JUSTIFICATIVA.....	52
OBJETIVOS.....	53
MATERIAIS.....	54
1. Microorganismos	54
2. Meios de cultura	54
3. Glicosaminoglicanos	54

4. Enzimas.....	55
5. Resinas	55
6. Anticorpos	55
7. Reagentes e outros materiais	55
8. Materiais e reagentes para Biologia Molecular	56
8.1. Plasmídeos	56
8.2. Reagentes e outros materiais	57
8.3. Enzimas	57
9. Equipamentos.....	58
MÉTODOS	60
1. Produção e purificação da heparinase nativa de <i>Flavobacterium heparinum</i>.....	60
1.1. Cultivo e indução de <i>Flavobacterium heparinum</i>	60
1.2. Purificação das liases induzidas de <i>Flavobacterium heparinum</i> : heparinase, heparitinasas I e II, condroitinase AC	61
1.2.1. Cromatografia em DEAE-agarose	61
1.2.2. Cromatografia em BioGel A-0.5 m.....	61
2. Clonagem e purificação da heparitinasase I e heparinase recombinantes de <i>Flavobacterium heparinum</i>	62
2.1. Obtenção do fragmento de DNA	62
2.1.1. Heparitinasase I	62
2.1.2. Heparinase	63
2.2. Clonagem do fragmento de DNA da Heparitinasase I e Heparinase em vetor de seqüenciamento pGEM-T	63
2.3. Clonagem em vetor de expressão	65
2.3.1. Heparitinasase I	65
2.3.2. Heparinase	65
2.4. Expressão das enzimas recombinantes.....	66
2.4.1. Heparitinasase I	66
2.4.2. Heparinase	66

2.5.	Mutagênese sítio dirigida	67
2.6.	Purificação das enzimas recombinantes	68
2.6.1.	Resina Ni ²⁺ -agarose	68
2.6.2.	Resina Q-Sepharose	68
3.	Análise dos produtos de degradação gerados pela ação das liases. 69	
3.1.	Ensaio de degradação enzimática	69
3.2.	Cromatografia em papel	69
3.3.	Cromatografia em Sistema SAX-HPLC	69
4.	Caracterização de glicosaminoglicanos e enzimas	70
4.1.	Eletroforese em gel de agarose	70
4.2.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	70
4.3.	Zimografia	71
4.4.	Imunoblotting	71
5.	Cinética Enzimática	72
5.1.	Efeitos do Ca ²⁺ sobre atividade da heparinase	72
5.2.	Efeito da temperatura e pH sobre atividade da heparinase	73
5.3.	Efeito de solventes orgânicos sobre valores de pKa da heparinase	74
5.4.	Efeito da relação D ₂ O/H ₂ O na atividade da Heparinase	74
5.5.	Efeito inibitório do condroitim sulfato supersulfatado sobre heparinase	75
6.	Fluorescência intrínseca do triptofano da heparinase	75
7.	Modificações químicas da heparina	75
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
1.	Purificação das enzimas induzidas de <i>Flavobacterium heparinum</i> : heparinase, heparitinase I e II, condroitinase AC	76
1.1.	Cromatografia de troca iônica aniônica	76
1.2.	Cromatografia em gel filtração	77
2.	Clonagem, expressão e purificação da heparitinase I recombinante. 78	

2.1.	Seleção de clones	78
2.2.	Sequenciamento do produto da PCR	79
2.3.	Expressão e purificação da heparitinase I recombinante.....	83
3.	Clonagem, expressão e purificação da heparinase recombinante.....	84
3.1.	Seleção de clones	84
3.2.	Sequenciamento do produto da PCR	85
3.3.	Expressão e purificação da heparinase recombinante	89
4.	Estudos cinéticos da heparitinase I	94
5.	Estudos cinéticos da heparinase.....	97
5.1.	Efeito do Ca^{2+} sobre atividade da heparinase	97
5.2.	Estudo da especificidade estrutural da heparinase pelo substrato.....	100
5.3.	Efeito da temperatura sobre atividade da heparinase.....	101
5.4.	Efeito do pH sobre atividade da heparinase	104
5.5.	Efeito de solventes orgânicos sobre valores de pKa da heparinase	108
5.6.	Efeito da relação $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ na atividade da Heparinase.....	109
5.7.	Efeito da mutação sítio dirigida de H165A e Q163A na atividade da heparinase.	111
5.7.1.	Atividade específica	111
5.7.2.	Efeito do pH na atividade de heparinase recombinante selvagem e mutantes H165A e Q163A	113
6.	Efeito Inibitório do condroitim sulfato super sulfatado sobre heparinase	115
	CONCLUSÕES	124
	RESUMO.....	128
	ABSTRACT.....	129
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
	Anexo1.....	157

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Estrutura dos Glicosaminoglicanos.....	3
Figura 2. Proteoglicanos: modo de ligação de glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto protéico.....	5
Figura 3. Distribuição dos glicosaminoglicanos sulfatados na escala filogenética (Cássaro & Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1983; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich et al., 1985; Nader et al.; 1984; Spillman et al., 1995; Chavante et al., 2000; Medeiros et al., 2000).....	6
Figura 4. Esquema da inter-relação do Ácido Hialurônico e Proteoglicanos nos tecidos.....	10
Figura 5: Cascata de Coagulação.....	22
Figura 6. Inibidores naturais da cascata da coagulação.....	23
Figura 7. Pentassacarídeo de heparina que se liga à antitrombina	24
Figura 8. Trombina e suas ações sobre fibrinogênio e proteína C.	25
Figura 9. Obtenção de Heparinas de baixo peso molecular (LMWH)...	27
Figura 10. Interação da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular com trombina e Fator Xa mediada por Antitrombina.....	27
Figura 11. Esquema de degradação de Heparan sulfato e Heparina por Exoenzimas em Mamíferos.....	31
Figura 12. Esquema de degradação enzimática de heparina.	36
Figura 13. Mecanismo eliminativo para degradação de polissacarídeos ácidos.....	38
Figura 14. Mecanismo de ação da heparinase sobre a heparina e heparitinase II sobre os produtos de degradação da heparina.....	40
Figura 15. Modo de ação de heparan sulfato e heparina liases sobre um glicosaminoglicano hipotético.....	40
Figura 16. Esquema do complexo Heparinase – dodessacarídeo de heparina, mostrando os principais domínios da enzima.....	46

Figura 17. Esquema da ligação de heparina dentro do sítio ativo de Heparinase.....	47
Figura 18. Esquema do mecanismo de catálise de Heparinase de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	49
Figura 19. Aumento da expressão de RNAm que codifica para Heparitinase I, em função do tempo de indução.....	61
Figura 20. Fracionamento do extrato cru de <i>F. heparinum</i> por cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-BioGel.....	76
Figura 21. Fracionamento de liases de <i>F. heparinum</i> em cromatografia de gel filtração.....	77
Figura 22. Produtos de PCR de diferentes colônias de <i>E. coli</i> transformada com plasmídeo recombinante para heparitinase I.....	78
Figura 23: Sequenciamento do fragmento de DNA que codifica para heparitinase I (vermelho) e alinhamento com sequência de DNA da heparitinase I clonada na literatura (Godavarti et al., 1996) (azul).....	80
Figura 24. Tradução da sequência de nucleotídeos do segmento de DNA que codifica para heparitinase I.....	82
Figura 25. Expressão e purificação da heparitinase I recombinante.	83
Figura 26: Produtos de PCR de diferentes colônias de <i>E. coli</i> transformada com plasmídeo recombinante para heparinase.....	84
Figura 27. Sequenciamento do fragmento de DNA recombinante que codifica para Heparinase (vermelho) e alinhamento com sequência de DNA da heparinase clonada na literatura (Sasisekharan et al. 1993) (azul).....	86
Figura 28. Tradução da sequência de nucleotídeos do segmento de DNA que codifica para heparinase.	87
Figura 29. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da heparinase de <i>F. heparinum</i> e <i>B. thetaiotaomicron</i>	88
Figura 30. Ensaio de expressão da heparinase recombinante de <i>F. heparinum</i>	90

Figura 31. Purificação da heparinase recombinante.	91
Figura 32: Fracionamento de rHepase em cromatografia de troca aniônica com resina Q-Sepharose.	92
Figura 33: Cromatograma dos produtos de degradação da heparina pela ação da heparinase.	93
Figura 34. Formação de produtos insaturados pela Htase I.....	95
Figura 35. Velocidade de reação enzimática em função da concentração de heparam sulfato.....	96
Figura 36. Efeito do Cálcio sobre atividade da heparinase.	98
Figura 37. Plote de Lineweaver-Burck da influência de cálcio na atividade da heparinase com aumento de concentrações de heparina. ...	99
Figura 38. Efeito da temperatura na catálise da heparinase.....	102
Figura 39. Inativação da heparinase a diferentes temperaturas em função do tempo e da temperatura de incubação.....	103
Figura 40. Efeito do pH na atividade da Heparinase.....	105
Figura 41. Modelo diprótico de equilíbrio rápido para o sítio ativo da heparinase.....	107
Figura 42. Efeito do isótopo D₂O na atividade da Heparinase.....	110
Figura 43. Atividade específica da heparinase selvagem e seus mutantes em H165A e G163A.....	112
Figura 44. Efeito do pH na atividade de Mut H165A e Mut Q163A.....	114
Figura 45. Comportamento eletroforético em gel de agarose de heparinas puras e contaminadas com condroitim sulfato supersulfatado.....	115
Figura 46. Ação de heparinase e heparitinase II sobre heparina e heparinas contaminadas por condroitim sulfato supersulfatado.....	116
Figura 47. Formação de produtos de degradação de heparina sob ação da heparinase na ausência e presença de OSCS.	117
Figura 48. Efeito inibitório de OSCS sobre atividade da heparinase. ..	118

Figura 49. Ensaio de ligação de heparina e OSCS em heparinase.....	119
Figura 50. Ensaio de deslocamento de OSCS da heparinase por heparina.....	120
Figura 50: Sítio de clivagem da heparina pela heparinase e possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise.	127

ÍNDICE DE TABELA

Tabela I. Glicosaminoglicanos: Unidades Estruturais e Nomenclaturas	2
Tabela II. Exosaminidases e Sulfatases de <i>F. Heparinum</i> induzida por heparina.....	34
Tabela III. Dados do alinhamento da heparinase de diferentes bactérias.	89
Tabela IV. Constante de Dissociação da Heparinase para derivados da Heparina	100
Tabela V. Valores termodinâmicos e de pK _a dos grupos prototrópicos do sítio ativo da heparinase.....	106
Tabela VI. Perturbações dos valores de pK _a do sítio ativo da heparinase por solventes orgânicos.....	108

Abreviaturas

AH: Ácido hialurônico

AT: antitrombina

BamHI: enima de restrição extraída de *Bacillus amyloliquefaciens* H (ATCC 49763)

BSA: *bovine serum albumin* (albumina bovina sérica)

Cam: cloranfenicol

CB: *calcium binding site*(sítio de ligação ao cálcio)

cDNA: DNA complementar

CS: condroitim 4- e 6- sulfato

CS-A: condroitim sulfato A

C4S: condroitim 4-sulfato

C6S: condroitim 6-sulfato

CTV: cetavlon

Δ : Presença de insaturação

ΔH : variação de entalpia

ΔS : variação de entropia

ΔF : variação de fluorescência

$\Delta U, 2S-GlcNS, 6S$: dissacarídeo insaturado trissulfatado de heparina e heparam sulfato- O-ácido 2-sulfo-L-idurônico-(1→4)-2-desoxi-2- sulfamino-D-glucopiranoose 6-O-sulfato

$\Delta U-GalNAc, 4S$: dissacarídeo insaturado N-acetilado 4-sulfatado de condroitim sulfato e dermatam sulfato - O-ácido-D-glucurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranoose-4-O-sulfato

Δ U-GalNAc,6S: dissacarídeo insaturado N-acetilado 6-sulfatado - O-ácido-D-glucurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranosose-6-O-sulfato

Δ U-GalNAc: dissacarídeo insaturado N-acetilado - O-ácido-D-glucurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-galactopiranosose

Δ U-GlcNAc: dissacarídeo insaturado N-acetilado do ácido hialurônico- O-ácido-D-glucurônico-(1→3)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose

Δ U-GlcNAc,6S: dissacarídeo insaturado N-acetilado 6-sulfatado - O-ácido-D-glucurônico-(1→4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose-6-O-sulfato

Δ U-GlcNAc: dissacarídeo insaturado N-acetilado - O-ácido-D-glucurônico-(1→4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosose

Δ U-GlcNS,6S: dissacarídeo insaturado dissulfatado - O-ácido-D-glucurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose 6-O-sulfato

Δ U-GlcNS: dissacarídeo insaturado N-sulfatado - O-ácido-D-glucurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose

Δ U,2S-GlcNS,6S-GlcUA-GlcNS,6S: tetrassacarídeo insaturado - O-ácido 2-sulfo-L-idurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose 6-O-sulfato-(1→4)-ácido-D-glucurônico-(1→4)-2-desoxi-2-sulfamino-D-glucopiranosose 6-O-sulfato

Δ U-Tetra: tetrassacarídeo insaturado

Δ U-Hexassacarídeo: hexassacarídeo insaturado

DEAE: dietilaminoetil

dNTPs: mistura dos 4 desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ddNTPs: didesoxirribonucleotídeos trifosfatados

DS: dermatam sulfato

DTT: ditioneitol

***EcoRI*:** enzima de restrição extraída de *E. coli* RY13

EDA: tampão etilenodiamina-acetato

EDC: 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDTA: etileno diamino tetra-acetato de di-sódio

E_M: coeficiente de extinção molar

FII a FXIII: fator II a XIII

FT: fator tecidual

GAG: glicosaminoglicano

Gal: galactose

GalN: galactosamina

GalNAc,6S: galactosamina N-acetilada, 6-sulfatada

GalNAc: galactosamina N-acetilada

GlcA: ácido glucurônico

GlcN: glucosamina

GlcNAc: glucosamina N-acetilada

GlcNS,6S: glucosamina N- e 6-dissulfatada

GlcNS: glucosamina N-sulfatada

HCII: cofator II da heparina

HE2: produtos dissacarídicos de heparina

HE4: substratos tetrassacarídicos de heparina

H151A: mutante inativa de heparinase

HE12: substratos dodessacarídeo de heparina

HEP: heparina

Hepase: heparinase

HepCarb-Red: heparina carboxi-reduzida

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

HepNAc: heparina α -D-glucosamina *N*-acetilada

HepNH₃: heparina α -D-glucosamina *N*-desulfatada

HepGalA: Heparina α -L-galacturonato

HepIdoA: heparina α -L-iduronato, 2-*O*-desulfatada

HMWK: *high molecular weight kininogen* (cininogênio de alto peso molecular)

HPLC: *high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)

HS: heparam sulfato

HtaseI: heparitinase I

HtaseII: heparitinae II

IdoA: ácido idurônico

IPTG: isopropiltiol- β -D-galactosideo

Kan: kanamicina

k_{cat}: constante catalítica

KK: *kallikrein* (calicreína)

K_D: constante de dissociação

K_I: constante de inibição

K_M: constante de Michaelis-Menten

K_{obs}: velocidade de inibição

K_S: constante de dissociação do primeiro passo da reação enzimática

LB: meio *Luria broth*

LPLC: *low pressure liquid chromatography* (cromatografia líquida de baixa pressão)

LMWH: *Low Molecular Weight Heparin* (heparina de baixo peso molecular)

Man: manose

M: molar

MM: massa molecular

Mut H165A: mutante de heparinase em histidina 165 por alanina

Mut Q163A: mutante de heparinase em glutamina 163 por alanina

MWCO: *Molecular Weight Cut Off*

Ncol: enzima de restrição extraída de *Nocardia corallina* (ATCC 19070)

NEM: N-etilmaleimida

OD: *optical density* (densidade ótica)

OSCS: *oversulfated chondroitin sulfate* (condroitim sulfato super sulfatado)

PAPS: fosfoadenosil-5'-fosfosulfato

pb: pares de base

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PC: proteína C

PCR: *polimerase chain reaction* (reação polimerase em cadeia)

PDA: 1,3-diaminopropano

PEG: polietilenoglicol

PG: proteoglicano

PGHS: proteoglicano de heparam sulfato

PK: pré-caliceína

pKa: constante de dissociação ácida em escala logarítmica

PKC: *protein kinase C* (proteína quinase C)

PL: fosfolipídeo

PS: proteína S

QS: queratam sulfato

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

Taq: *Termus aquaticus*

TEMED: N,N,N,N tetrametiletilenodiamina

Tet: tetraciclina

TFPI: *tecidual factor pathway inhibitor* (inibidor da via do fator tecidual)

TM: trombomodulina

tPA: ativador de plasminogênio tecidual

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UFH: *unfractionated heparin* (heparina não fracionada)

XhoI: enzima de restrição extraída de *Xanthomonas holcicola* (ATCC 13461)

Xil: xilose

INTRODUÇÃO

1. Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares que apresentam, como estrutura básica, unidades dissacarídicas repetitivas, formadas por uma hexosamina (β -D-glucosamina, α , β -D-glucosamina ou β -D-galactosamina) unida por ligação O-glicosídica a um ácido urônico (β -D-glucurônico ou α -L-idurônico) ou a um açúcar neutro (β -D-galactose). Cada unidade pode ainda apresentar grupos sulfato que, juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, conferem a estes polímeros alta densidade aniônica (Brimacombe & Weber, 1964; Dietrich, 1984; Jackson, Busch & Cardin, 1991). Devido à carga negativa, os GAGs são altamente hidrofílicos, incorporando grande quantidade de água em sua estrutura (Hatae, Atsuta & Makita, 1977). Foram primeiramente denominados mucopolissacarídeos, quando isolados no início do século XX (Meyer, 1938). A partir da década de 1960 passou-se a utilizar a nomenclatura de Jeanloz (1960).

Os glicosaminoglicanos mais comuns encontrados em tecidos de mamíferos são:

- Ácido Hialurônico (AH), Queratam sulfato (QS), Heparan sulfato (HS) e Heparina (HEP) – denominados glucosaminoglicanos devido à presença de glucosamina.
- Condroitim sulfato (CS) e Dermatam sulfato (DS) – denominados galactosaminoglicanos, devido à presença de galactosamina;

Os diversos glicosaminoglicanos sulfatados possuem massas moleculares variando entre 5 e 100 kDa. Por outro lado, o ácido hialurônico (AH), que é um GAG não sulfatado, pode apresentar massa molecular da ordem de mais de 1.000.000 de Da.

Os principais glicosaminoglicanos conhecidos estão listados na Tabela I, bem como suas unidades estruturais e nomenclaturas. A Figura 1 apresenta as principais características estruturais dos glicosaminoglicanos.

Tabela I. Glicosaminoglicanos: Unidades Estruturais e Nomenclaturas

Glicosaminoglicanos	Dissacarídeos				
	Açúcar não nitrogenado	Ligação intra-dissacarídica	Hexosamina		
Ácido Hialurônico	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GlcN Ac	$\beta 1 \rightarrow 4$	Ligação inter-dissacarídica
Condroitím sulfato	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (4S)		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (6S)		
Dermatam sulfato	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (4S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (6S)		
	L-IdoA	$\alpha 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (4S)		
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (4S)		
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 3$	D-GalN Ac (6S)		
Queratam sulfato	D-Gal	$\beta 1 \rightarrow 3$	D-GlcN Ac	$\alpha 1 \rightarrow 4$	
Acaram sulfato	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN Ac		
Heparam sulfato	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN Ac		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN Ac (6S)		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S, 6S)		
	L-IdoA	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)		
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)		
Heparina	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)		
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S, 6S)		
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)		
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S, 6S)		

GlcA, ácido glucurônico; IdoA, ácido idurônico; GlcN, glucosamina; GalN, galactosamina; Ac, acetil; S, sulfato.

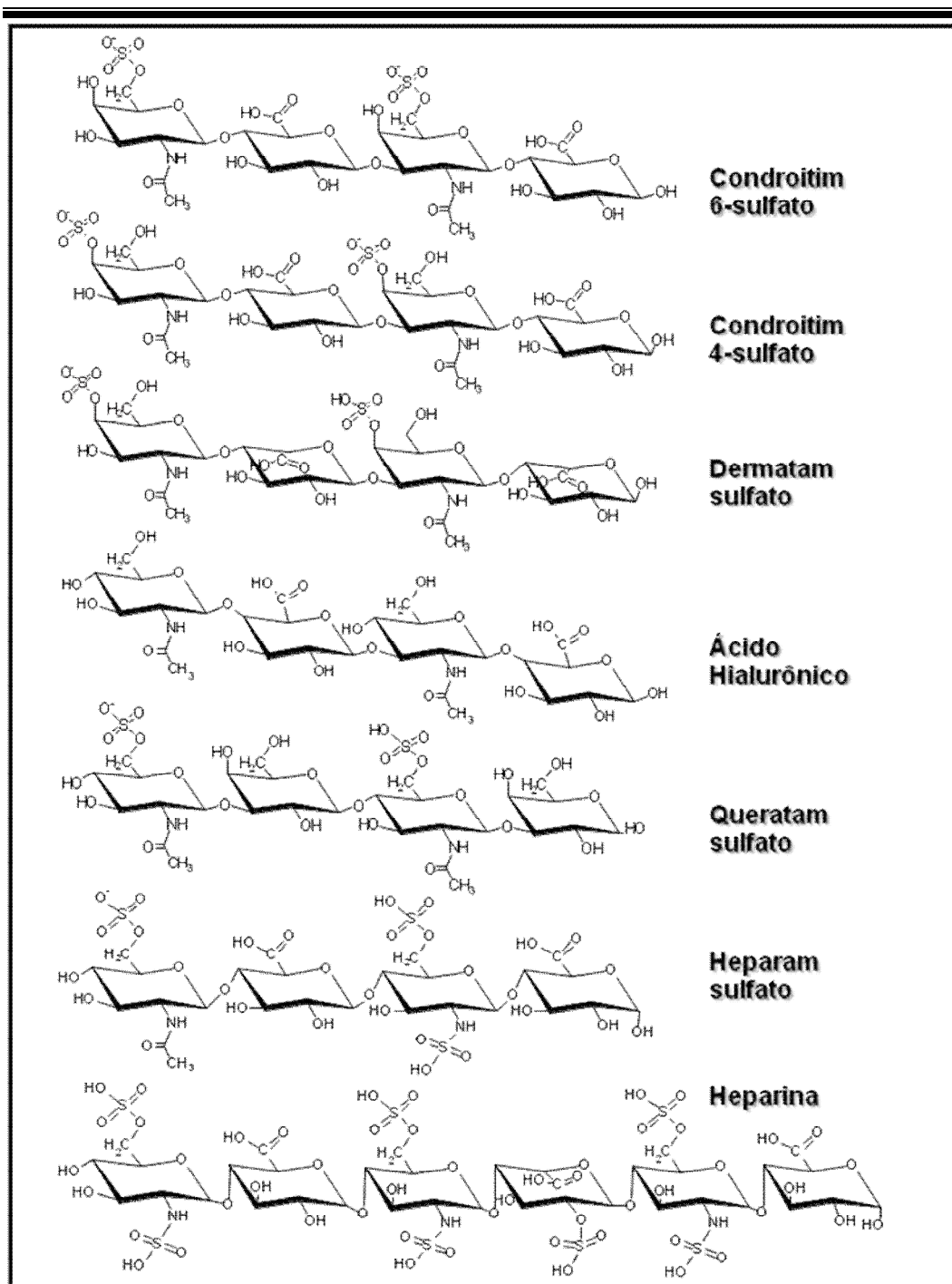


Figura 1. Estrutura dos Glicosaminoglicanos.

A Figura ilustra a unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. A D-glucosamina é a hexosamina da heparina, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico e a D-galactosamina está presente em condroitim 4 e 6-sulfatos e dermatom sulfato. O açúcar não nitrogenado é um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico), exceto no queratam sulfato que apresenta D-galactose. Os grupamentos sulfatos podem estar localizados em C-2 e C-6 na hexosamina e C-2 no ácido urônico. A hexosamina está unida ao ácido urônico por ligação α 1-4 na heparina e no heparam sulfato e β 1-4 nos demais compostos (Dietrich, 1984; Sampaio et al., 2006).

No início do século XX, condroitim sulfato de cartilagem era o único polissacarídeo de tecido conjuntivo conhecido. Na década de 1950 foi demonstrado que condroitim sulfato ocorria covalentemente ligado à proteína nos tecidos conjuntivos. Helen Muir fez as primeiras análises de aminoácidos em preparações de condroitim sulfato e concluiu que o polissacarídeo se encontra ligado aos resíduos de serina (Muir, 1958). A explicação desta ligação veio por Meyer e colaboradores (1950), que mostrou que o grupo hidroxila da cadeia lateral de serina estava envolvido em uma ligação O-glicosídica com o polissacarídeo, a qual é susceptível à clivagem por β -eliminação.

Todos os GAGs, com exceção do ácido hialurônico, ocorrem nos tecidos, ligados covalentemente a um esqueleto protéico, formando os proteoglicanos (PGs) (Thonar & Sweet, 1977; Lohmander et al., 1980; Nilson, De Luca & Lohmander, 1982). A ligação entre o esqueleto protéico e os glicosaminoglicanos é feita via um tetrassacarídeo composto de β -D-glucuronosil(1 \rightarrow 3)- β -D-galactosil(1 \rightarrow 3)- β -D-galactosil(1 \rightarrow 4)-xilose (GlcUA-Gal-Gal-Xil), por uma ligação O-glicosídica entre o terminal redutor da xilose e a hidroxila do resíduo de serina do esqueleto protéico (Róden & Smith, 1966) (Figura 2). A extremidade não redutora do tetrassacarídeo está unida à cadeia de glicosaminoglicano pelo resíduo glucuronosil. Na região de ligação do heparam sulfato à proteína, a xilose está fosforilada em C2 (Fransson, Silverberg & Carlsted, 1985) e na região de ligação do condroitim sulfato à proteína, foi detectada sulfatação em C4 nos resíduos de galactose (Sugahara et al., 1988). Acredita-se que estas fosforilação e sulfatação sejam um sinal de ativação para que as enzimas da biossíntese sintetizem heparam sulfato e condroitim sulfato, respectivamente (Oegema et al., 1984; Fransson, Silverberg & Carlsted, 1985; Sugahara et al., 1988; Ueno et al., 2001; Tone et al., 2008).

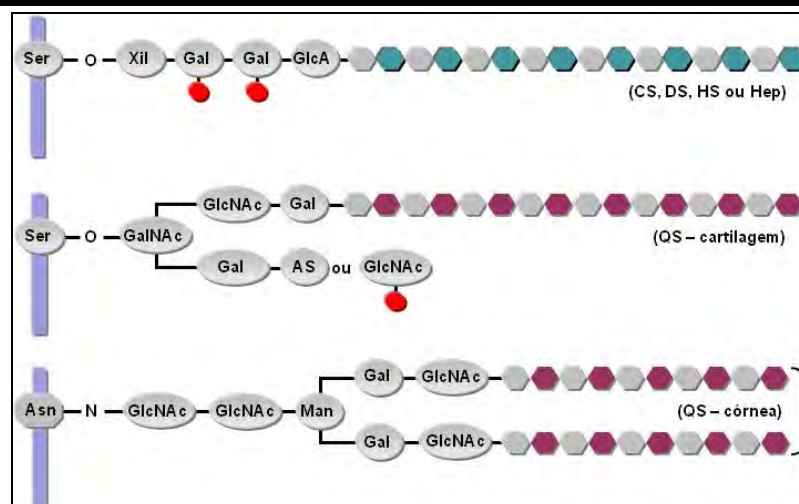


Figura 2. Proteoglicanos: modo de ligação de glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto protéico.

Condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e heparina (Hep), queratam sulfato (QS); GalNAc, N-acetil-D-galactosamina; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; AS, ácido siálico; Man, D-manose; Ser, L-serina, Asn, L-asparagina; hexosamina; ácido urônico; possível sítio de sulfatação (Figura modificada de HARDINGHAM & FOSANG, 1992).

Condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina estão unidos ao esqueleto protéico pelo mesmo tipo de região de ligação. Já, a ligação do queratam sulfato a proteínas é distinta dos demais GAGs (Figura 2). O proteoglicano de queratam sulfato tipo I (córnea) apresenta-se ligado à cadeia de proteína por uma ligação *N*-glicosídica entre uma *N*-acetilglucosamina e o grupo amida da cadeia lateral de asparagina (Baker, Cifonelli & Róden, 1975), enquanto o proteoglicano de queratam sulfato tipo II (cartilagem) liga-se à proteína por uma ligação *O*-glicosídica, estabelecida entre uma *N*-acetilgalactosamina presente no terminal redutor com o grupamento hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina ou treonina (Bray, Leeberman & Meyer, 1967; Seno & Toda, 1970; Dickenson, Huckerby & Nieduszyński, 1990; Hardingham, Fosang & Dudhia, 1994).

As funções biológicas dos proteoglicanos estão fortemente associadas às cadeias de glicosaminoglicanos (Thonar & Sweet, 1977; Lohmander et al., 1980; Nilson, De Luca & Lohmander, 1982; Dietrich, 1984; Sampaio et al., 2006; Nader et al., 1999a; Dreyfuss et al., 2009).

2. Distribuição, função biológica e atividade farmacológica de glicosaminoglicanos

O estudo da distribuição dos GAGs em diferentes tecidos foi importante para o conhecimento da função biológica dessas moléculas. Tais funções foram sugeridas com base na sua localização celular, seja como constituinte da matriz extracelular, da superfície celular ou de grânulos citoplasmáticos, relacionando as funções dos tecidos com as propriedades físico-químicas desses compostos.

Glicosaminoglicanos estão presentes em todas as espécies de animais que possuem organização tissular, distribuídos desde espongiários até mamíferos (Cássaro & Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1983; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich et al., 1985; Nader et al., 1984; Spillman et al., 1995; Chavante et al., 2000; Medeiros et al., 2000) (Figura 3).

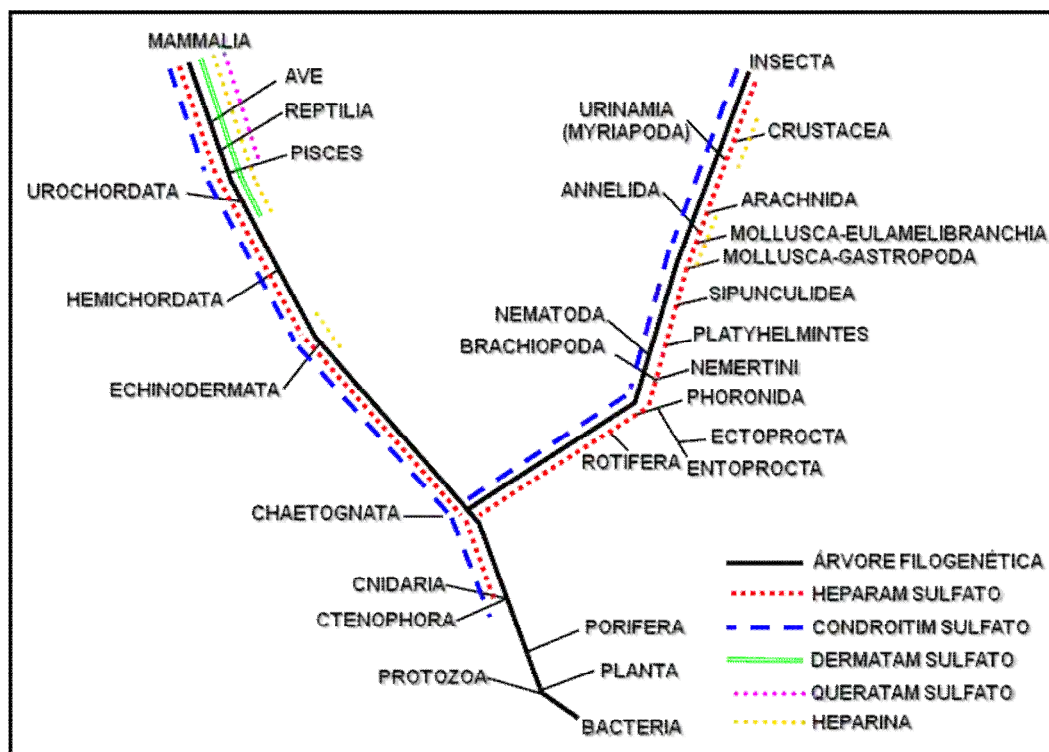


Figura 3. Distribuição dos glicosaminoglicanos sulfatados na escala filogenética (Cássaro & Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1983; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Dietrich et al., 1985; Nader et al., 1984; Spillman et al., 1995; Chavante et al., 2000; Medeiros et al., 2000).

Glicosaminoglicanos sulfatados são amplamente distribuídos no reino animal do domínio eukarya, contudo, não são encontrados entre as bactérias. Heparosan e condrosan são as versões não sulfatadas de heparam e condroitim sulfatos encontrados na cápsula de algumas bactérias patogênicas. Esses GAGs agem como camuflagem molecular do microrganismo, facilitando a infecção. Hialuronam também está presente em algumas bactérias patogênicas, apresentando função similar (DeAngelis, 2002). GAGs sulfatados estão ausentes em protistas, plantas e fungos. No reino animal, começa a ser evidenciada a presença de HS e CS em todas as espécies analisadas que possuem tecido verdadeiro, classificados como eumetazoa, desde ctenophora até mamíferos. DS começa a aparecer mais tardiamente, a partir dos deuterostômios (Sampaio & Nader, 2006). Por outro lado, a distribuição de heparina ocorre de maneira difusa, tanto em alguns invertebrados como em espécies vertebradas.

Heparina e heparam sulfato estão ligados a diferentes esqueletos protéicos e se localizam em diferentes compartimentos celulares. Heparina é encontrada exclusivamente dentro de vesículas de mastócitos de algumas espécies animais (Nader & Dietrich, 1989; Nader et al., 1999a; Nader, et al., 1980; Straus et al., 1982; Straus, Nader & Dietrich, 1982; Straus et al., 1984; Cavalcanti et al., 2000; Santos et al., 2003; Dietrich et al., 1985; Dietrich et al., 1989; Dietrich et al. 1999a; Santos et al., 2002) enquanto que HS está presente na superfície celular de todos os tecidos tanto de espécies de vertebrados quanto de invertebrados (Cássaro & Dietrich, 1977; Dietrich et al, 1977; Toledo & Dietrich, 1977; Dietrich et al., 1980; Gomes e Dietrich, 1982; Dietrich et al., 1983; Nader et al., 1983; Nader et al., 1984; Moreira et al., 2004). Diferente de HS, heparina está presente somente em alguns tecidos de vertebrados e invertebrados. Heparina está presente em tecidos que possuem contato direto com o ambiente, como pulmão (brânquias), pele e intestino. Uma importante observação é que tecidos de coelho não contêm heparina, por não apresentarem mastócitos (Straus et al., 1982). Em camundongos com diferentes genótipos para precursores de mastócitos, aqueles que não apresentavam estas células, também não possuíam heparina. Heparina não

era substituída por outro GAG naqueles animais, e a estrutura do heparam sulfato era mantida. Em estudos usando camundongos geneticamente selecionados para produção de anticorpo foi observado uma correlação inversa entre conteúdo de heparina e resposta de anticorpo. Esses resultados levaram à conclusão que heparina deveria estar envolvida com mecanismos de defesa do organismo contra patógenos, sem um envolvimento direto com produção de anticorpo. É improvável que a função biológica da heparina esteja relacionada com a prevenção da coagulação sanguínea, já que espécies que são deficientes em heparina não apresentaram disfunção na coagulação, e espécies que não apresentam sistema de prevenção da coagulação dependente de antitrombina contêm grande quantidade de heparina.

Medeiros et al. (2000) isolou glicosaminoglicanos sulfatados de 23 espécies de 13 filos de invertebrados e verificou que o HS estava presente em todas as espécies analisadas; o CS foi encontrado em 20 espécies; e HEP, em 12 espécies. Além disso, esses autores avaliaram a atividade anticoagulante de heparina de várias espécies e constatou que heparina de crustáceos, equinodermatas e camarões apresentavam baixa atividade anticoagulante, ao contrário da heparina de molusco, que apresentou alta atividade anticoagulante, quando comparado com a heparina de mamífero. Essa diferença estava relacionada com as diferenças estruturais entre as moléculas.

HS está presente em todas as espécies com organização tissular e apresenta variabilidade estrutural de acordo com o tecido e espécie de origem. Sua localização celular, diversidade estrutural e flutuação de expressão em diferentes condições fisiológicas, como divisão celular, crescimento celular, diferenciação celular, leva a proposição de que HS desempenha uma função específica em interações celulares.

A extraordinária variabilidade estrutural dos glicosaminoglicanos torna-os capazes de se ligar a uma grande diversidade de moléculas biológicas. Assim, já foram descritas diversas funções para os GAGs, tais como: controle de água e eletrólitos; regulação da atividade nuclear; transporte de cálcio, quelantes de cálcio; lubrificação; cicatrização; controle da divisão celular; resistência à infecção; adesão, sinalização, migração e reconhecimento celular; coagulação; estruturação da matriz extracelular; resposta imune, entre outras (Aquino, Lee

& Park, 2010). Porém, a capacidade de interação dos GAGs, e portanto PGs, também pode acontecer com moléculas que fogem do funcionamento normal do organismo, como por exemplo, com patógenos microbianos. Esta ligação é essencial para o sucesso da infecção microbiana, porque permite sua invasão, transmissão célula-a-célula, disseminação sistêmica e infecção de órgãos secundários, além da evasão do mecanismo de defesa do hospedeiro (Aquino, Lee & Park, 2010).

Como já mencionado, em bactérias não são encontrados GAGs sulfatados. No entanto, em cápsulas de bactérias patogênicas (gênero *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pasteurella* e *Moraxella*) são encontrados polissacarídeos lineares com um esqueleto de unidades dissacarídicas repetitivas contendo um amino açúcar N-acetilado e ácido β -D-glucurônico, tais como ácido hialurônico (hialuronam), condroitim não sulfatado (condrosam) e heparam não sulfatado (heparosam), aparentemente não ligado covalentemente a um esqueleto protéico (Roberts, 1996; Rodriguez et al., 1988; Vann et al., 1981; Wilson et al., 2005). A presença de GAGs nas cápsulas parece servir como camuflagem, barreira de proteção e uma ferramenta de adesão (DeAngelis, 2002; DeAngelis e Padgett-McCue, 2000).

3. Tipos de Glicosaminoglicanos

A distinção entre os diversos glicosaminoglicanos é feita de acordo com o tipo de açúcar não nitrogenado (ácido urônico ou açúcar neutro), tipo de hexosamina (galactosamina ou glucosamina), grau e posição de sulfatação e tipo de ligação inter-dissacarídica e intradissacarídica (Mathews, 1975; Dietrich, et al., 1998; Sampaio and Nader, 2006).

3.1. Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico, também conhecido como hialuronan ou hialuronato (HA), tem como unidades dissacarídicas o ácido D-glucurônico (GlcA) e a N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidos por ligação intradissacarídica do tipo β -1,3 e ligação interdissacarídica β -1,4 (Brimacombe & Webber, 1964).

Sua estrutura tridimensional é semelhante a uma longa hélice estirada estabilizada por pontes de hidrogênio (Laurent & Fraser, 1986; Lidholt, Kjéllen & Lindahl, 1989). Sua longa cadeia (massa molecular da ordem de milhões de Da) não se liga covalentemente à proteína, mas reúne e organiza as cadeias de proteoglicanos pela proteína de ligação (Figura 4).

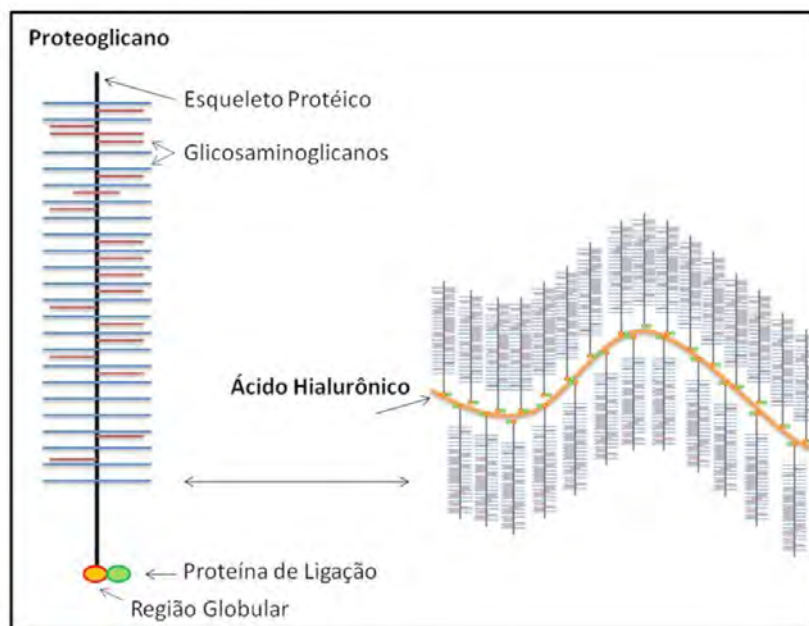


Figura 4. Esquema da inter-relação do Ácido Hialurônico e Proteoglicanos nos tecidos.

Muitas funções têm sido atribuídas ao ácido hialurônico, tais como estabilização da matriz extracelular, lubrificação de articulações, homeostase da água, regulação da distribuição de proteínas plasmáticas, barreira contra propagação de agentes infecciosos e macromoléculas, regulação de atividades celulares pela interação com proteínas receptoras de superfície celular (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997). O HA encontra-se elevado em fluidos de pacientes que apresentam patologias relacionadas a doenças hepáticas e de articulações, bem como em esclerose sistêmica, mielofibroses, oftalmopatia de Graves, septicemia, uremia e câncer (Laurent, et al.; 1996; Martins et al.; 2003; Martins et al., 2004).

3.2. Condroitim Sulfato

Os condroitins 4- e 6-sulfatos são constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas de *N*-acetil-galactosamina-*O*-sulfatada, respectivamente em C-4 e/ou em C-6, e GlcA unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$. O ácido glucurônico por sua vez, se liga à *N*-acetilgalactosamina por ligações do tipo $\beta(1-3)$. As estruturas destes compostos são híbridas, pois o condroitim 6-sulfato pode apresentar certa porcentagem de sulfatação na posição C-4 e vice-versa. Por exemplo, o condroitim 6-sulfato da cartilagem de tubarão contém 5% de sulfatação na posição C-4 (Michelacci & Dietrich, 1976; 1986) e o condroitim 4-sulfato de cartilagem de baleia, 33% de sulfatação em C-6 (Michelacci & Dietrich, 1986).

Os condroitim sulfatos são componentes característicos da matriz dos tecidos conjuntivos, e juntamente com o ácido hialurônico possuem a função de reter água no tecido, favorecendo, por exemplo, o amortecimento da cartilagem contra pressões (Muir & Hardingham, 1975). O condroitim 6-sulfato está relacionado com a integridade dos tecidos sujeitos à forças mecânicas, uma vez que são característicos de cartilagens articulares (Michelacci et al., 1979; Michelacci & Horton, 1989), enquanto que o condroitim 4-sulfato parece estar envolvido nos processos de crescimento e ossificação (Mourão et al., 1973; 1976; Michelacci et al., 1979; Carney & Muir, 1988; Michelacci & Horton, 1989), pois é característico de cartilagens em crescimento e está relacionado com patologias como artrose, condromas, condrossarcomas e calo ósseo (Mourão, Michelacci & Toledo, 1979; Michelacci, Laredo & Dietrich, 1981).

O condroitim 6-sulfato parece também estar relacionado com o mecanismo de divisão celular, impedindo o contato entre as células (Dietrich & Armelin, 1978; Dietrich & Montes de Oca, 1978; Dietrich et al., 1980; Dietrich et al., 1982; Dietrich, 1984). Foi observado também um aumento de condroitim 6-sulfato em diversos tecidos neoplásicos (Sampaio, Dietrich & Gianotti, 1977; Dietrich et al., 1978; 1980).

Durante a agregação plaquetária induzida por vários agentes farmacológicos, observa-se a liberação de um proteoglicano de condroitim sulfato de alta massa molecular (240 KDa) que está presente no glicocálix e

nos grânulos. Este composto parece estar associado à inibição da agregação plaquetária induzida por ADP e vários outros agentes farmacológicos (Allie et al.,1988; Nader,1991; Donato et al.,1994).

3.3. Dermatom Sulfato

O dermatam sulfato é um glicosaminoglicano encontrado em uma grande variedade de tecidos de vertebrados. Apresenta-se como um copolímero linear polidisperso de *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido L-idurônico (IdoA) e GlcA com grupamentos sulfatos comumente encontrados na posição C-4 dos resíduos de GalNAc e ocasionalmente na posição C-6 dos resíduos de GalNAc e C-2 dos resíduos de IdoA. O dermatam sulfato, anteriormente referido como condroitim sulfato B, difere do condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato, pela presença do IdoA em sua estrutura (Fransson,1968a, 1968b; Fransson & Malmström,1971; Malmström & Fransson,1971; Michelacci & Dietrich,1974;1975; Población & Michelacci,1986).

No reino animal o aparecimento de condroitim sulfato coincide com a emergência de eumetazoa, que são animais que apresentam tecidos verdadeiros. CS foi encontrado em todos os tecidos de todas as espécies estudadas. Por outro lado, o aparecimento de dermatam sulfato é um evento tardio na evolução, estando restrito ao aparecimento de deuterostomios (Sampaio & Nader, 2006).

O dermatam sulfato foi isolado da matriz extracelular de tecidos conjuntivos como pele, tendão e esclera, assim como músculo esquelético, veias, ossos e cartilagens, onde, junto com o colágeno, elastina e outras glicoproteínas, desempenha um importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido (Toledo & Dietrich,1977; Lindahl & Höök,1978; Fransson,1985; Población & Michelacci,1986), participando da deposição e manutenção das fibras de colágeno (Scott, 1992).

A presença do ácido idurônico em DS está relacionada com as funções biológicas relacionadas aos domínios conhecidos como “blocos de ácido idurônico”. Duas DS-epimerases (DS-epi1 e DS-epi2) convertem ácido

glucurônico em ácido idurônico. Ratos deficientes em DS-epi1 têm 25% de seu peso reduzido no nascimento e se tornam adultos pequenos. Sua pele é mais frágil, apresentam anormalidades histológicas e fibras de colágeno com diâmetro aumentado, além de alteração na membrana basal epidérmica e capilar (Maccarana et al., 2009).

Dentre algumas de suas atividades farmacológicas, destacam-se a atividade anticoagulante, porque interage com cofator II da heparina (HCII), potencializando a inibição dessa serpina sobre a trombina; e atividade lipásica, associada ao grau de sulfatação (Tollefson, Majerus & Blank, 1982; Tollefson, Pestka & Monafó, 1983).

3.4. Queratam Sulfato

Queratam sulfato (QS) apresenta como unidade dissacarídica, N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato (GlcNAc,6S) e D-galactose (Gal), unidos por ligação intradissacarídica β -1,4 e interdissacarídica β -1,3 (Bhavanandan & Meyer, 1967; Brimacombe & Webber, 1964). Algumas vezes a sulfatação ocorre em C6 da D-galactose (Brown et al., 1994).

Entre os proteoglicanos de queratam sulfato, podemos citar o lumican que apresenta um papel importante na transparência da córnea (Blochberger et al., 1992), e a fibromodulina relacionada com processos de adesão celular e fibrinogênese (Plaas et al., 1990). Cabe ainda mencionar a presença de cadeias de queratam sulfato no proteoglicano de agrecan, encontrado em cartilagem. O papel do queratam sulfato neste tecido está relacionado com a parada do crescimento e processo de ossificação, uma vez que em cartilagens adultas QS representa cerca de 25% do total de glicosaminoglicanos, enquanto que em cartilagens de recém-nascidos o mesmo não é detectado (Michelacci et al., 1979; Michelacci et al., 1981).

Hayashi, Kadomatsu e Ishiguro (2010) investigaram a participação de QS no processo inflamatório intra-articular e degradação de cartilagem associados à artrite. Os autores verificaram que a administração intraperitoneal de QS melhora a artrite *in vivo* e suprime a degradação de cartilagem *ex vivo*, apresentando potencial terapêutico no tratamento de artrites inflamatórias.

Lumican está presente na córnea, disco intervertebral e tendão. Kiga et al., (2010) demonstraram que QS desempenha uma importante função na geração de novas redes de colágeno por células fibroblásticas. Hayashi et al. (2010) observaram que lumican facilita a infiltração dos neutrófilos na cavidade da córnea no processo de extravasamento de neutrófilos polimorfonucleares durante a fase aguda inflamatória da cicatrização do epitélio corneal. Outros autores (Zeltz et al., 2010) verificaram que lumican impede a progressão de melanoma por inibir migração celular.

3.5. Heparan Sulfato

Heparan sulfato é o glicosaminoglicano que exibe mais alta variabilidade estrutural entre os tecidos e espécies de origem (Dietrich, Nader & Straus, 1983; Nader et al., 1999a). Foi isolado pela primeira vez de fígado e pulmão bovino por Jopes e Gardell em 1948 e nomeado primeiramente ácido heparino monossulfúrico. Linker e colaboradores renomearam a substância heparitin sulfato em 1958, logo depois passando para heparan sulfato.

Heparan sulfato contém vários tipos de unidades dissacarídicas formadas por ácido β -D-glucurônico e α -L-idurônico ligados à D-glucosamina, podendo ser N-acetilada (GlcNAc), N-sulfatada (GlcNS), N-acetilada 6-sulfatada (GlcNAc,6S) ou N,6-dissulfatada (GlcNS,6S). Ocorre também uma pequena proporção de resíduos de ácido α -L-idurônico sulfatada no C2 (Dietrich et al., 1971; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Silva, Dietrich & Nader, 1976; Nader et al., 1987; Tersariol et al., 1994). Como na heparina, suas ligações interdissacarídicas são do tipo α -1,4, e as intradissacarídicas são α -1,4 para o ácido idurônico, e β -1,4 para o ácido glucurônico. O heparan sulfato difere estruturalmente da heparina por apresentar maior conteúdo de GlcA e GlcNAc (Cifonelli & Dorfman, 1960; Taylor et al., 1973; Dietrich & Nader, 1974; Höök, Lindahl & Iverius, 1974; Silva, Dietrich & Nader, 1976; Dietrich et al., 1983; Nader et al., 1987; Turnbull & Gallagher, 1990; Tersariol et al., 1994; Dietrich et al., 1998).

A análise do heparan sulfato de diferentes origens demonstrou que sua estrutura é extremamente conservada (Dietrich et al., 1983; 1998; Tersariol et

al., 1994). Heparam sulfatos são constituídos de cinco tipos de unidades dissacarídicas cuja proporção varia de acordo com o tecido e a espécie de origem (Silva et al., 1976; Dietrich, Nader & Straus, 1983; Nader et al., 1984). Por degradações com heparitinases específicas, isoladas de *Flavobacterium heparinum*, foi demonstrado que a estrutura do heparam sulfato é composta por unidades dissacarídicas que são distribuídas em regiões variáveis formadas por blocos contendo: GlcUA(1,4)GlcNAc, GlcUA(1,4)GlcNS, IdoUA(1,4)GlcNAc6S, IdoUA(1,4)GlcNS6S e IdoUA2S(1,4)GlcNS6S, e duas regiões constantes, uma contendo o tetrassacarídeo IdoUA-GlcNAc-IdoUA-GlcNS, e no terminal não redutor, a presença de GlcNS ou GlcNS,6S (Nader et al., 1987; Tersariol et al., 1994; Dietrich et al., 1998). Há variações no grau de sulfatação, acetilação e na proporção destas unidades dependendo do tipo celular. O sequenciamento do heparam sulfato presente no molusco *Anomantidae sp.* mostrou que a distribuição dos blocos de dissacarídeos é semelhante ao descrito para mamíferos (Ferreira et al., 1993; Nader et al., 1988). Já, o heparam sulfato presente na superfície da célula endotelial apresenta maior quantidade do dissacarídeo IdoUA2S(1,4)GlcNS6S na sua estrutura (Nader et al., 1987).

Os heparam sulfatos estão localizados nas membranas plasmáticas e na membrana basal (Dietrich & Montes de Oca, 1970; Kraemer, 1971; Kraemer & Tobey, 1972; Dietrich & Armelin, 1978; Dietrich & Montes de Oca, 1978; Kanwar & Farquhar, 1979; Dietrich, 1984; Salmivirta, Lidholt, Lindahl, 1996), regulando as interações entre as células e o seu meio, interações estas importantes para o crescimento e o desenvolvimento normais e para manutenção das funções celulares. Esta molécula também é encontrada no interior da célula, associada em parte ao núcleo (Fedarko and Conrad, 1986).

Em fígado de ratos parcialmente hepatectomizados induzidos a um intenso estímulo de divisão celular, foi observada uma diminuição significativa do heparam sulfato coincidente com o pico mitótico (Dietrich et al., 1980; Dietrich, 1984). Em células em cultura observa-se também uma diminuição do heparam sulfato na fase pré-mitótica (Kraemer & Tobey, 1972; Porcionatto et al., 1994; Porcionatto, 1996; Porcionatto et al., 1998; Moreira et al., 2004; Lopes, Dietrich & Nader, 2006). Em nosso laboratório, foi mostrado que o papel do HS

no ciclo celular pode estar relacionado com PKC (proteína quinase C, uma família de serina-treonina quinases). PKCs estão envolvidas na regulação de uma variedade de funções celulares, incluindo proliferação, expressão de genes, ciclo celular, diferenciação, organização do citoesqueleto, migração celular e apoptose. Sindecam-4, PG formado pela ligação de cadeias de heparam sulfato ao esqueleto protéico, localiza-se na superfície celular e seu domínio citoplasmático interage com PKC- α ativando-a (Oh & Couchman, 2003; Lim, Longley, Couchman et al., 2003; Simons & Horowitz, 2001; Beauvais & Rapraeger, 2004; Simons & Horowitz, 2001; Porcionatto, 1996; Porcionatto et al., 1998; Moreira et al., 2004; Lopes, Dietrich & Nader, 2006). Esse conjunto de dados reforçam o possível papel dos heparam sulfatos no reconhecimento e divisão celular. Dados recentes do nosso laboratório mostraram que a super-expressão do oncogene EJ-ras altera o ciclo celular de células endoteliais, via cascatas de sinalização celular, levando ao aumento na expressão de sindecam-4 (um proteoglicano de heparam sulfato) e à diminuição da expressão de enzimas envolvidas na epimerização e O-sulfatação do heparam sulfato de forma semelhante ao observado para heparam sulfatos de tumores (Lopes et al., 2006; Pazos et al., 2007).

Lopes-Lima et al. (2005), analisando a composição de glicosaminoglicano no molusco *Anodonta cygnea*, se depararam com uma curiosa variação sazonal destes polímeros. No inverno foi quantificado somente ácido hialurônico na hemolinfa; enquanto que no verão, tanto ácido hialurônico, quanto heparam sulfato estavam presentes nos fluidos corpóreos. Como o período de mineralização do molusco é mais evidente no verão, os autores observaram uma relevante função do heparam sulfato nos mecanismos de biomineralização da concha do molusco.

Recentemente, foi sugerido que no fígado, proteoglicanos de HS desempenhariam função central na depuração de lipoproteínas independentemente de receptores de LDL (Bishop, Stanford & Esko, 2008). Ainda, proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) mediam a invasão da forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos e que heparam sulfato e heparina também estão implicados na invasão de amastigotos, diminuindo a taxa de infecção do protozoário quando este é tratado com

heparam sulfato ou heparina (Bambino-Medeiros et al., 2011). Assim, o conhecimento do modo como proteínas de *T. cruzi* se ligam ao heparam sulfato podem oferecer uma ferramenta importante no desenvolvimento de terapias para doença de Chagas.

3.6. Heparina

3.6.1. Histórico

Heparina foi descoberta por McLean, em 1916, como parte do estudo da ação tromboplástica da cefalina, a fim de determinar se as propriedades anticoagulantes observadas naquela substância residiam no conteúdo de fosfolípideo ou em alguma impureza. A atividade anticoagulante relacionava-se com o conteúdo de fosfolípideo da amostra. Só em 1925 (Howell, 1925) foi que amostras de heparina livres de fosfolípidos mostraram conter carboidrato através de análises colorimétricas qualitativas. Em 1928, o mesmo autor detectou a presença de ácido glucurônico como constituinte da molécula de heparina (Howell, 1928). Em 1935, Erick Jorpes, por análises quantitativas, relatou, pela primeira vez, a participação de hexosamina como componente da heparina, respeitando a razão molar de hexosamina para ácido urônico de 1:1. Em 1936, hexosamina foi cristalizada do hidrolisado de heparina e caracterizada como glucosamina, com base na forma do cristal, na rotação ótica, na análise de nitrogênio e determinação do ponto de fusão (Jorpes & Bergtrom, 1936). Em 1946, Jorpes concluiu que a heparina seria o mais forte dos ácidos encontrados no corpo de animal, devido ao conteúdo de mais de 2 grupos sulfato por resíduo de ácido. Assim, heparina emergiu como um polissacarídeo composto de unidades dissacarídicas repetidas e um alto conteúdo de sulfato. Em 1945, Wolfrom e McNeely mostraram que a quantidade de sulfato liberado a partir da hidrólise ácida de heparina era metade da quantidade de grupos amino livres gerados, logo, os autores descartaram a idéia da presença de átomos de nitrogênio sulfatados em heparina. Em 1950, Jorpes, Bostrom e Mutt mostraram que sulfato e amino grupos eram liberados simultaneamente em quantidades equimolares quando heparina era submetida à hidrólise ácida leve, evidenciando a presença de

grupos sulfoamido em heparina. A identidade do componente ácido urônico demorou 40 anos pra ser definida, desde sua identificação por Howell em 1928 até os anos de 1960. Em 1935, Jorpes assumiu, como Howell já havia feito, que o ácido urônico de heparina era do tipo ácido D-glucurônico, mas, em 1962, Cifonelli e Dorfman relataram que haviam achado ácido L-idurônico, o epímero C-5 do ácido D-glucurônico, no hidrolisado de heparina que havia sido dessulfatado e N-acetilado em laboratório. Com o avanço dos métodos de análise estrutural, os cientistas começaram a identificar ácido L-idurônico em suas preparações de heparina, levando à confirmação da participação deste ácido na estrutura de heparina e em proporção maior que a do ácido D-glucurônico. Esses achados foram fortemente evidenciados em estudos com produtos da clivagem deaminativa de heparina (Lindahl, 1966b) e estudos de NMR (Perlin et al., 1968; Perlin e Sanderson, 1970; Perlin, Mackie e Dietrich, 1971; Casu, 1985). A configuração α foi estabelecida para o ácido L-idurônico, além da confirmação do envolvimento de C-4 na ligação uronídica por estudos conclusivos de NMR feitos por Perlin, Mackie e Dietrich (1971), no qual investigaram o principal dissacarídeo trissulfatado (4-O-(4-desoxi- α -L-threo-hex-4- α -ácido enopiranosilurônico 2-sulfato) - (2-desoxi-2-sulfoamino-D-glicopiranosose 6-sulfato) obtido pela digestão de heparina por heparinase bacteriana. Em 1961, foi mostrado que o grupo hidroxila de C-3 da glucosamina não é substituído, o que permitia aos pesquisadores da época concluir que a ligação uronídica envolvia C-4 ou C-6 da glucosamina (Nominé, Bucourt e Bertin, 1961). Os dados mostraram ser C-4 o carbono envolvido na ligação urônica. C-6 não estava disponível para metilação, sendo considerado o sítio de uma O-sulfatação. A ligação (1-4) entre C-1 da glucosamina e C-4 do ácido urônico já havia sido proposta em 1950 por Wolfrom e col. (Wolfrom et al., 1950). O grupo éster sulfato (O-sulfato) de heparina é encontrada em C-6, na maioria dos resíduos de glucosamina. Wolfrom e col. concluíram por experimentos de oxidação, que a porção do resíduo de ácido urônico de heparina é sulfatada (Wolfrom et al., 1950). Essa afirmação foi completada por Foster e col. que mostraram que metade do conteúdo de ácido urônico em heparina é sulfatada em C-2 (Foster et al., 1963). Um terço do ácido glucurônico é sulfatado (Danishefsky et al., 1969). Lindahl e Axelsson (1971)

isolaram pela primeira vez ácido idurônico sulfatado diretamente dos produtos da clivagem deaminativa. Como os autores não acharam mais do que traços de ácido glucurônico na amostra isolada, concluíram ser o ácido idurônico o principal sítio de sulfatação de ácido urônico em heparina. Só em 1985 o ácido glucurônico 2-sulfato emergiu novamente, como parte da composição de dissacarídeos isolados dos produtos da clivagem deaminativa de heparina, ainda sim em proporção muito pequena (Bienkowski and Conrad, 1985). Em 1969, foi sugerido que aproximadamente 20% dos resíduos de glucosamina também apresentavam grupo sulfato na posição C-3 (Danishefsky et al., 1969). Somente 10 anos depois em estudos detalhados da estrutura do sítio de heparina que se liga à antitrombina pelo grupo de Lindahl, a existência de grupo sulfato em C-3 foi diretamente evidenciada (Lindahl et al., 1979).

3.6.2. Características Estruturais

Heparina apresenta resíduos de ácido α -L-idurônico (70-80%) e β -D-glucurônico (20-30%), com sulfatação no C2 do ácido L-idurônico (70-90%), sendo raramente sulfatada no ácido D-glucurônico. A glucosamina é usualmente sulfatada nas posições N- e C6 (Dietrich, 1968; Dietrich, 1969a, 1969b, 1969c; Jorpes, Bostrom & Miutt, 1950). As ligações intradissacarídicas são do tipo α -1,4 para o ácido idurônico e β -1,4 para o ácido glucurônico. As ligações interdissacarídicas são do tipo α -1,4. Essas características estruturais foram observadas para heparinas usadas na Medicina, que são preferencialmente extraídas e purificadas de mucosa intestinal suína e bovina, bem como inicialmente de pulmão bovino. Os dados estruturais levaram à proposição que a principal unidade na estrutura da heparina era constituída por um hexassacarídeo contendo 2 dissacarídeos trissulfatados compostos por ácido idurônico 2-O-sulfato e glucosamina N-6-dissulfatada e 1 dissacarídeo dissulfatado constituído por ácido glucurônico e glucosamina-N-6-dissulfatada (Figura 1).

Essas unidades hexassacarídicas encontram-se em vários graus de polimerização, formando um conjunto de moléculas de massa molecular que varia de 3000 a 30000 Da aproximadamente. Esta polidispersidade foi melhor

observada por eletrofocalização, mostrando a presença de pelo menos 21 espécies de moléculas, nas quais a principal diferença é o comprimento. O intervalo de massa molecular entre as diversas frações está em torno de 1500 e 2000 Da, que corresponde à massa molecular da unidade hexassacarídica (NADER et al., 1974; DIETRICH et al., 1975; McDUFFIE et al., 1975). Foi também demonstrado nesses trabalhos pela primeira vez que a atividade anticoagulante da heparina estava relacionada diretamente a seu tamanho molecular. Assim, heparinas de baixa massa molecular apresentavam atividade anticoagulante significativamente menor do que aquelas de maior massa molecular, e portanto a atividade da heparina não fracionada refletia o conjunto das diferentes moléculas (Nader et al, 2004).

3.6.3. Heparina e Hemostasia

O principal efeito da heparina na cascata de coagulação é acelerar a inativação dos fatores de coagulação (serino-proteases) por serpinas, em especial a antitrombina. Heparina tem sido usada clinicamente como anticoagulante a mais de 75 anos (Fareed et al, 1989; Nader et al, 2004; Li et al., 2009). É uma das primeiras drogas biopoliméricas e uma das poucas drogas que são carboidratos. Em 1935 começaram a ser feitos testes clínicos com heparina pelos laboratórios de Berne, Estocolmo e Toronto simultaneamente (Crafoord, 1939). O primeiro sucesso do uso de heparina na prevenção de trombose pós-operatória foi realizado pelo grupo de Toronto e descrito por Best (1959). Heparina também foi usada no tratamento de trombose venosa estabelecida em estágio inicial, com destaque para o tratamento de trombose na veia central da retina, o que pode levar à cegueira e glaucoma. Assim, a heparina tornou-se o principal alvo de estudo para tratamento de doenças tromboembolíticas até os dias de hoje, além de ser essencial em cirurgias cardiovasculares, na circulação extracorpórea do sangue através de máquinas.

O processo de coagulação inicia-se com a lesão do vaso sanguíneo. Neste momento há um breve período de vasoconstrição local, com a finalidade de limitar o fluxo sanguíneo e facilitar o acúmulo de material hemostático no

local da lesão (Chen & Tsai, 1948). Ocorre, então, aderência das plaquetas à parede vascular lesada por causa da exposição da matriz subendotelial, a qual é trombogênica e promove ativação plaquetária (Zucher & Borelli, 1958). Fatores plaquetários são liberados, provocando recrutamento de novas plaquetas para adesão e agregação plaquetária, formando o tampão plaquetário. A partir desta etapa, começa uma série de reações com a finalidade de parar o sangramento e reparar o tecido.

Diversos fatores de coagulação participam do processo, muitos desses apresentando-se como pró-enzimas (zimogênios), que devem ser ativadas no momento da coagulação. A formação do coágulo envolve duas vias: intrínseca ou via do fator de contato e extrínseca ou via do fator tecidual, ambas levando à ativação do Fator X. A via comum leva à formação de trombina, que atua sobre fibrinogênio convertendo-o em fibrina.

- ***Vias Extrínseca, Intrínseca e Comum***

Fator III ou Fator Tecidual (FT) é uma proteína transmembrânica que funciona como receptor e inicia a fase de pró-coagulação. Quando ocorre a lesão do endotélio do vaso sanguíneo, este receptor é exposto e entra em contato com as proteínas plasmáticas, ligando-se ao fator FVII, na presença de Ca^{2+} (Versteeg & Ruf, 2006; Tilley & Mackman, 2006). Este complexo, denominado tenase extrínseco (FT- Ca^{2+} -FVII), inicia o processo de coagulação, ativando os fatores FIX e FX (Butenas, van't Veer & Mann, 1997; Tilley & Mackman, 2006) (Figura 5). Nesta fase é formada uma pequena quantidade de trombina, porém capaz de ativar os fatores FV, FVII, FVIII, necessários para a via intrínseca e comum, levando à formação de fibrina (Butenas, van't Veer & Mann, 1997).

A via intrínseca envolve componentes presentes no meio intravascular. Lesão do endotélio do vaso sanguíneo expõe superfícies aniônicas de membrana e matriz, ao qual se liga o FXII. Pré-caliceína, FXI e FXII circulam no sangue como complexos com cininogênio de alto peso molecular (HMWK). Assim, FXII e pré-caliceína se ligam ao local da lesão, via HMWK. A forma ligada à membrana do FXII ativa pré-caliceína em caliceína, que ativa o FXII por clivagem proteolítica. FXIIa ativa FXII ligado à membrana no complexo

HMWK, e FXIIa ativa FIX, que, em presença de FVIIIa, fosfolípídeo e íons Cálcio, formam o complexo tenase que ativa FX em FXa (Figura 5).

Por fim, o fator Xa complexa-se com o Fator Va em presença de fosfolípídeo e íons Cálcio e converte protrombina em trombina, no chamado complexo protrombina. A trombina formada converte fibrinogênio plasmático em fibrina, e o fator FXIIIa catalisa a formação de ligações cruzadas na molécula de fibrina, para formar um coágulo maduro (Davie, 2003; Bouças et al., 2006).

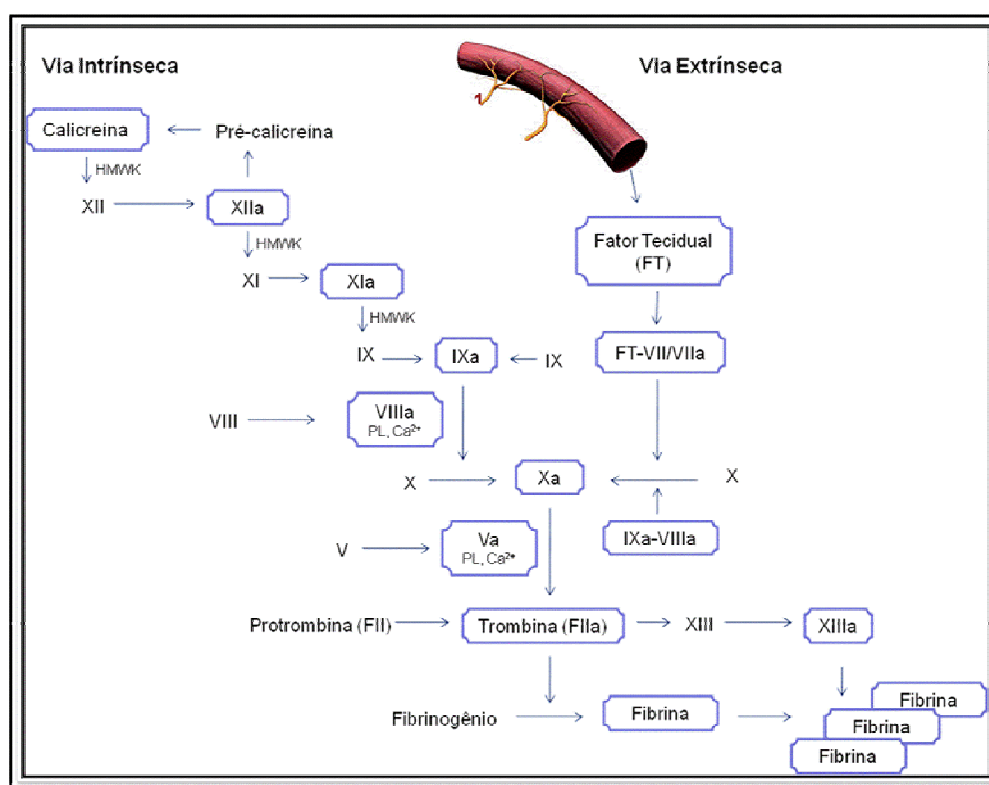


Figura 5: Cascata de Coagulação.

II a XIII, zimogênios; IIa a XIIIa, fatores de coagulação ativados; HMWK, cininogênio de alto peso molecular; PL: fosfolípídeo de membrana; Ca²⁺, íons cálcio.

- **Inibição da Coagulação e Fibrinólise**

Simultaneamente aos processos de formação do trombo, independentemente da via ativada, existe a ação de fatores anticoagulantes (fisiológicos) que impedem a propagação desse trombo, tais como serpinas e serino-proteases. Entre as serpinas, desempenham papel fundamental

antitrombina (AT), cofator II da heparina (HCII) e inibidor da via do fator tecidual (TFPI). Entre as serino-proteases, a proteína C ativada (PCa) e seu co-fator protéico, proteína S (PS) (Figura 6).

A inibição do complexo FT-FVIIa- Ca^{2+} -FXa ocorre pela interação com inibidor da via do fator tecidual (TFPI). TFPI é um inibidor multienzimático, ou seja, cada um de seus domínios separados inibe a ação de uma das enzimas. Complexo e inibidor são endocitados e degradados, porém uma pequena quantidade do FVIIa retorna à superfície como proteína intacta e é uma das fontes de FVIIa circulante. Este fator não tem efeito deletério, pois só é ativo quando complexado com FT (Brummel, Butenas & Mann, 1999) (Figura 6).

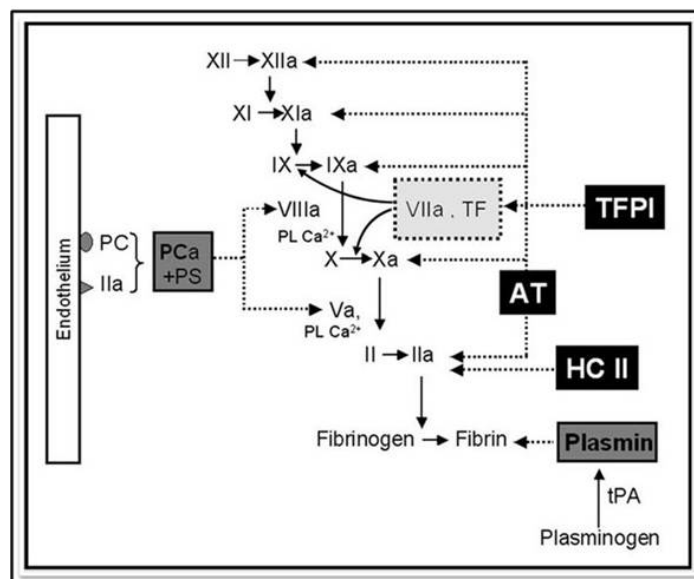


Figura 6. Inibidores naturais da cascata da coagulação.

II a XII, diferentes zimogênios e pró-fatores; IIa a XIIa, diferentes fatores ativados; TF, fator tecidual; AT, antitrombina, HC II, cofator II de heparina; TFPI, inibidor da via do fator tecidual tPA, ativador de plasminogênio tecidual; PC, proteína C; PS, proteína S. ▲, trombomodulina (receptor de trombina); • receptor da proteína C. (Bouças et al, 2006).

Antitrombina III, atualmente denominada de antitrombina (AT), é um inibidor de serino protease (serpina) que inibe várias hidrolases da coagulação, em especial, trombina e fator FXa (Figura 6). Quando AT se liga à heparina ocorre uma mudança conformacional que aumenta a afinidade de AT à trombina em ~ 9000 vezes e ao fator FXa em ~ 17000 vezes. No mínimo 18 unidades sacarídicas de heparina são necessárias para ativar a formação do complexo AT-trombina. Heparina apresenta uma sequência pentassacarídica

específica em que um resíduo de glucosamina 3-O-sulfatada é um importante componente de ligação à AT (GlcNac-6S-GlcA-GlcNS-3OS-6OS-IdoA-2S-GlcNS-6S) (Lindahl et al., 1980; Li et al., 2009; Xiao et al., 2009) (Figura 7).

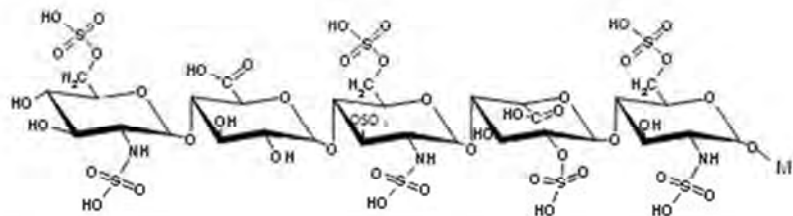


Figura 7. Pentassacarídeo de heparina que se liga à antitrombina

Cofator II de heparina (HCII) também é uma serpina que inibe especificamente trombina, mas não apresenta ação sobre fator FXa. HCII pode ser ativado por vários GAGs, como heparina, HS e DS, sendo importante o grau de sulfatação e a densidade de cargas. GAGs aceleram a formação do complexo HCII-trombina, em parte pelo fornecimento de um suporte ao qual se ligam ambos HCII e trombina (Bourin & Lindahl, 1993) (Figura 6).

Proteína C (PC) é outra serino-protease plasmática que ocorre sob a forma de zimogênio. Para ser ativada necessita estar ligada a seu receptor (receptor de PC) presente na célula endotelial e ocorre pela ação da trombina ligada à trombomodulina, também presente na célula endotelial, em presença de íons cálcio; este complexo está ligado à membrana (Figura 6). Para atividade, PCa requer um outro cofator protéico, a proteína S (PS) que, complexada à proteína Ca (PCa:PS) inibe a coagulação por proteólise limitada dos fatores Va e VIIIa. Trombomodulina é um receptor de trombina que, quando forma o complexo trombina-trombomodulina- Ca^{2+} , diminui a especificidade de trombina por fibrinogênio e aumento para proteína C. Trombina de pró-coagulante passa a ser anticoagulante. Este mecanismo de retroalimentação é uma importante ferramenta de equilíbrio entre formação e dissolução do coágulo (Bourin & Lindahl, 1993) (Figura 8).

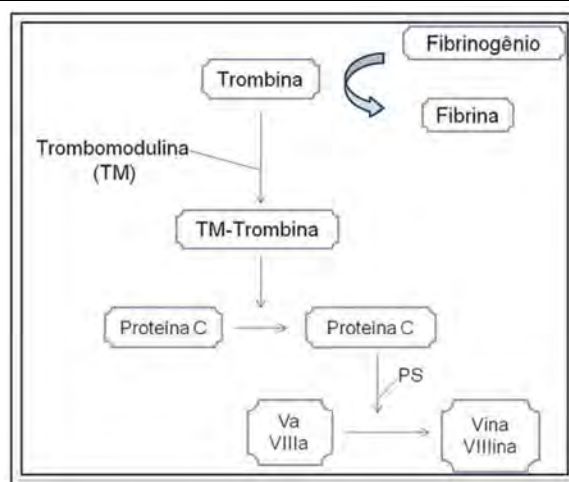


Figura 8. Trombina e suas ações sobre fibrinogênio e proteína C.

PC, zimogênio da proteína C; PCa; proteína C ativada; PS, proteína S, cofator da proteína Ca; Va, fator V ativado; Vlla; fator VIII ativado; Vina, fator V inativado; Vllina, fator VIII inativado.

A dissolução do coágulo acontece quando ocorre a quebra da capa de fibrina pela ação da enzima plasmina, formada a partir de plasminogênio. Plasminogênio é ativado pelo ativador de plasminogênio tecidual (tPA) (Figura 6). O resultado são peptídeos solúveis.

O efeito anticoagulante da heparina é, portanto, mediado por sua interação com antitrombina, aumentando seu efeito inibitório sobre trombina e outras serino-proteases da coagulação. O efeito antitrombótico é consequência de sua ação sobre as diferentes serpinas, bem como sobre células, em especial a célula endotelial, e diferentes fatores de crescimento. Seu efeito hemorrágico deve-se a sua interferência no “balanço hemostático”. Em modelo de cauda escarificada de ratos, heparina apresentou atividade hemorrágica, a qual só foi revertida com adição de ATP, ADP e miosina não desnaturada, sugerindo a participação da musculatura lisa da parede vascular no controle primário da hemostasia (Cruz & Dietrich, 1967; Nader & Dietrich, 1974).

Heparina pobre em regiões de ligação à AT apresenta baixa atividade anticoagulante. Um estudo recente mostrou que esta categoria de heparina pode ser eficiente no tratamento da malária severa. A ligação de eritrócitos parasitados pelo *Plasmodium falciparum* aos eritrócitos não infectados, formando as chamadas rosetas, está associado com malária severa. Heparina já foi testada em tratamento de malária severa, mas devido a sua capacidade

de provocar sangramento, estes testes foram abandonados. Heparina com pouca atividade anticoagulante mostrou romper as rosetas e a citoaderência *in vitro* e *in vivo*, fazendo dessas heparinas um adjunto na terapia em malária severa (Leitgeb et al., 2011).

3.6.4. Heparina de baixo peso molecular (LMWH)

As heparinas de baixo peso molecular (LMWH – *Low Molecular Weight Heparin*) foram descritas nos anos 70 (Dietrich, Nader & McDuffie, 1975; Hirsh & Levine, 1992). São fragmentos de heparina comercial produzidos por diferentes métodos, como clivagem com heparinase; degradação controlada com ácido nitroso; benzilação seguida de hidrólise alcalina; hidrólise com peróxido de hidrogênio (Figura 9). Cada método produz alterações estruturais específicas que levam a diferentes atividades farmacológicas.

Heparina não fragmentada (UFH) é uma população de moléculas com diferentes pesos moleculares. Quando fracionadas, as moléculas de heparina apresentam diferentes atividades anticoagulantes, porém a mesma atividade antitrombótica e anti-fator Xa *in vivo*. LMWHs mantêm a atividade antitrombótica e reduzem a atividade anticoagulante (Bianchini et al, 1985; Ofosu & Barrowcliffe, 1990; Nader et al., 1999b; Dietrich et al., 1999b). Além disso, oferecem uma melhor biodisponibilidade, maior tempo de vida no plasma e reprodutibilidade superior da resposta anticoagulante (Hirsh & Levine, 1992; Collignon et al., 1995).

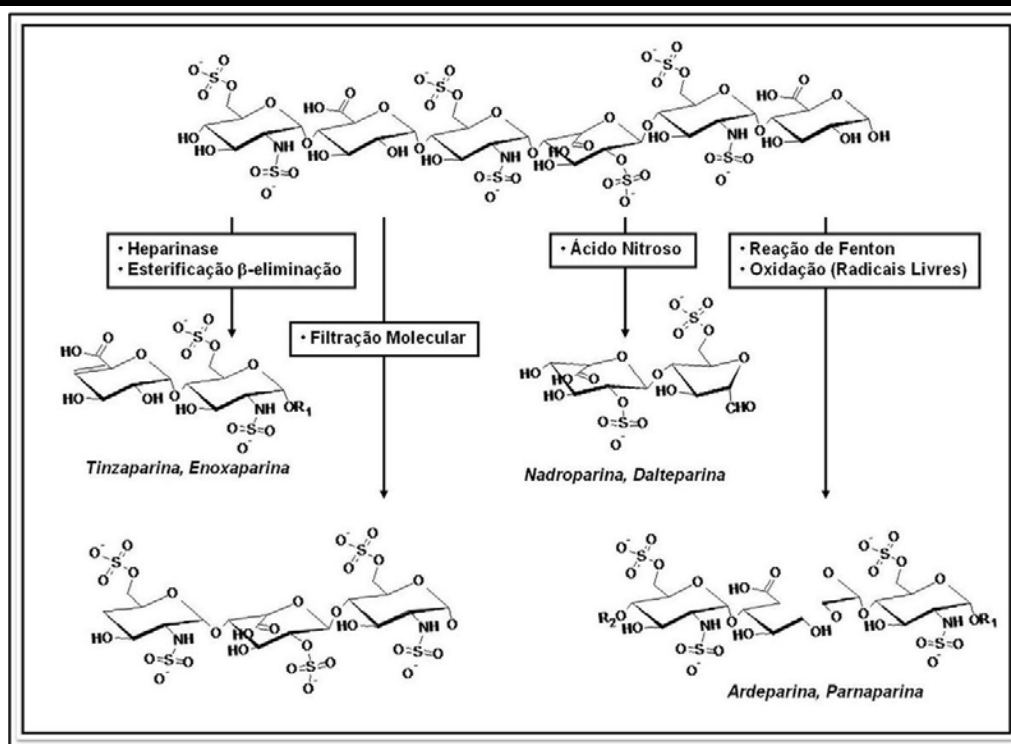


Figura 9. Obtenção de Heparinas de baixo peso molecular (LMWH)

A diferença de atividade entre heparina padrão (heparina não fracionada) e LMWH está associada ao menor tamanho da cadeia de heparina quando fragmentada, que previne a formação do complexo ternário AT-heparina-trombina (Figura 10) (Nader et al, 2004).

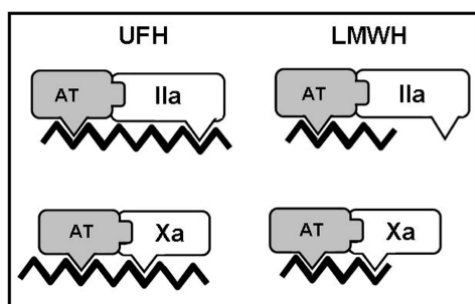


Figura 10. Interação da heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular com trombina e Fator Xa mediada por Antitrombina.

AT, antitrombina; Il2, trombina; Xa, fator Xa; UFH, heparina não fracionada; LMWH, heparina de baixo peso molecular.

As LMWHs são utilizadas em doenças trombóticas venosas e arteriais, bem como na profilaxia dessas doenças; cirurgias de grande porte; tratamento de doenças arteriais coronarianas e prevenção na formação de trombo em hemodiálise (Hirsh et al., 2001; Harvey & Offord, 2000; Cohen, 2000; Noble & Spencer, 1998; Cohen et al., 2000; Merli et al., 2001; Noble, Peters & Goa, 1995).

3.6.5. Heparina e OSCS

Heparina tem atraído bastante atenção por protagonizar uma das maiores crises de contaminação que tem levado à morte muitos pacientes. Lotes de heparina contaminados com condroitim sulfato super sulfatado (OSCS) vêm causando graves reações adversas em pacientes submetidos a tratamentos com essa droga. Isto resultou em um aumento no interesse no estudo da estrutura da heparina e na aplicação de suas enzimas de degradação, como heparinase, para caracterização de heparina. Além disso, faz-se necessário o entendimento da interação entre os fatores de coagulação, heparina (2-3 grupos sulfato por unidade dissacarídica, 12-15 kDa) e OSCS (unidades dissacarídicas com 4 grupos sulfato, 18 kDa), este último consistindo na super sulfatação do condroitim sulfato 4 sulfato. OSCS apresenta similaridade estrutural e físico-química com heparina, o que torna essas moléculas facilmente co-purificadas (Li et al, 2009; Lühn, Schiemann & Alban, 2011). Ácido idurônico e grupos sulfatos apresentam uma função importante na modulação da atividade antitrombótica e anticoagulante de heparina. Altos níveis de sulfatação e a flexibilidade conformacional do ácido idurônico promove uma interação muito mais justa entre proteínas básicas (fatores de coagulação) e heparina. Logo, a influência do OSCS sobre o equilíbrio hemostático pode ser explicado pelo alto nível de sulfatação e pela similaridade estrutural do ácido glucurônico 2,3-dissulfatado do OSCS com o ácido idurônico 2-sulfatado da heparina (Li et al, 2009).

A heparina apresenta maior atividade anticoagulante que o OSCS. OSCS nem CS-A inibe atividade anti-FXa, mas OSCS apresenta significativa atividade anti-FIIa, pois interage com HCII. Heparina apresenta ambas as atividades sobre FXa e FIIa, consistente com sua interação com HCII e AT (Li

et al, 2009). Li et al. (2009) examinaram e propuseram um mecanismo para a interação entre heparina e OSCS com proteínas da cascata de coagulação, do sistema complemento e da via cinina-caliceína. Após injeção intravenosa de heparina ou OSCS, a superfície negativamente carregada dessas moléculas permitiu a ligação de ambos FXII e pre-caliceína (PK). Esses GAGs competem pela ligação do cininogênio de alto peso molecular (*high molecular weight kininogen* – HMWK) com o heparan sulfato da superfície do vaso endotelial. Após a formação do complexo FXII-PK-HMWK e sua ativação (FXIIa-PK-HMWK), ambos, heparina e OSCS, se ligam ao FXII, PK e HMWK, mas só OSCS se liga ao FXIIa. Como heparina não liga a FXIIa, esta molécula se desliga do complexo e fica exposta a proteases do plasma, sendo inativada. Logo, na presença de heparina, FXIIa não é capaz de converter PK em caliceína (KK) e o complexo PK-HMWK fica protegido da hidrólise de HMWK em bradicinina. Em contraste, FXIIa firmemente ligado a OSCS tem seu complexo formado, resultando na liberação de bradicinina. Estudos *in vivo* mostraram que GAGs reduzem a liberação de bradicinina, diminuindo processos inflamatórios. Assim, os sistemas cinina-caliceína, complemento e de coagulação podem justificar a resposta anafilática observada em pacientes que receberam heparina contaminada por OSCS por via intravenosa.

Heparina e OSCS se ligam à antitrombina (AT) com alta afinidade, mas em sítios diferentes, sendo que heparina muda a conformação de AT, mas OSCS não muda, não apresentando, portanto, atividade anticoagulante mediada por AT (Li et al., 2009). OSCS também não apresenta atividade anti-FXa e anti-FIIa. Porém, aumenta a atividade anti-FIIa de heparina mediada por AT, provavelmente estabilizando o complexo heparina-ATIII-FIIa-OSCS de forma não competitiva. Isso explica porque heparina, e não OSCS, media a inibição de FXa pela AT. OSCS pode ainda afetar o sistema fibrinolítico, ativando plasminogênio, o que explica os efeitos de sangramento associados com heparina contaminada. Por fim, OSCS induz ativação de proteínas do complemento C3a e C5a (Li et al., 2009).

4. Degradação da Heparina e Heparan sulfato

4.1. Eucariotos

O catabolismo dos proteoglicanos foi estudado pela primeira vez em células da granulosa de ovário de ratas (Yanagishita & Hascall, 1984) e células de carcinoma de cólon (Iozzo, 1987). Este processo inicia-se com a endocitose do proteoglicano e, dentro dos lisossomos, a molécula sofre degradação proteolítica do esqueleto protéico. Nesta fase, a cadeia de polissacarídeo é parcialmente clivada em resíduos específicos, por uma endo- β -glucuronidase, liberando oligossacarídeos de 5 a 7 kDa. No passo seguinte, os oligossacarídeos são totalmente degradados por exoglicosidases, como glicuronidases, hexosaminidases e sulfatases, agindo sequencialmente e alternadamente a partir do terminal não redutor, com liberação de hexosamina, ácido urônico e sulfato inorgânico (Yanagishita & Hascall, 1984) (Figura 11).

Dietrich (1970) caracterizou pela primeira vez a existência de uma sulfamidase envolvida na degradação de heparina/heparan sulfato em tecidos linfóides de mamíferos. As doenças decorrentes de erros inatos do catabolismo dos glicosaminoglicanos, conhecidos como mucopolissacaridoses, mostraram deficiência em enzimas específicas envolvidas na degradação dessas moléculas (Kresse & Glossl, 1987; Neufeld & Muenzen, 1995; Toma et al, 1996).

Heparanase, enzima encontrada em mamíferos, é uma endo- β -glucuronidase envolvida na degradação de heparan sulfato e heparina. Quanto ao mecanismo de ação, classifica-se como hidrolase, ou seja, cliva a ligação glicosil-oxigênio com gasto de uma molécula de água e sem introdução de insaturação. Heparanase reconhece regiões altamente sulfatadas, ricas em ácido idurônico, intercaladas por regiões com baixo grau de sulfatação (GlcNAc-GlcUA) (Bame et al., 2000; Lyon & Gallagher, 1998) e cliva o espaço entre esses dois domínios. O cDNA da heparanase humana codifica uma pré-pró-proteína com um peptídeo-sinal, removido quando internalizado no retículo endoplasmático. A pró-proteína de 65kDa resultante é extensamente processada, pela remoção de 157 aminoácidos N-terminais, resultando na heparanase madura de 50kDa. Esta proteína de 50kDa é inativa quando

expressa em células de mamífero e a forma ativa da enzima foi proposta ser um heterodímero formado pelo fragmento de 50 kDa ligado a outro de 8 kDa através de um terceiro fragmento de 6 kDa (Levy-Adam et al., 2003).

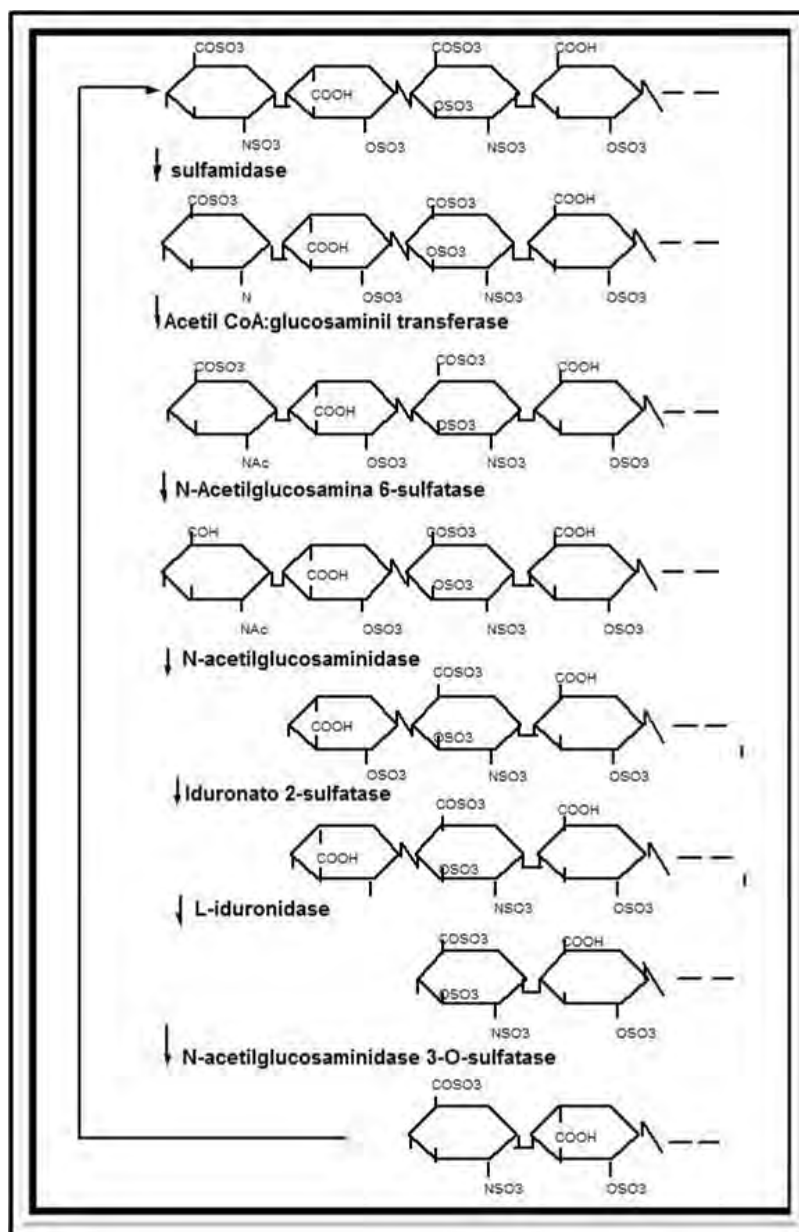


Figura 11. Esquema de degradação de Heparan sulfato e Heparina por Exoenzimas em Mamíferos.

Heparanase humana desempenha crucial função estrutural e regulatória, modulando importantes processos normais e patológicos que vão desde

embriogênese, morfogênese e desenvolvimento (Perrimon & Bernfield, 2000), a inflamação, angiogênese e metástase tumoral (Sasisekharan et al., 2002; Liu et al., 2002). Células tumorais metastáticas, mas não todos os tumores, estimulam a atividade da heparanase, e um aumento da expressão de seu RNAm correlaciona-se com invasividade (Vlodavsky et al., 1999; Hulett et al., 1999; Nakajima et al., 1988; Parish et al., 2001; Vlodavsky et al., 1994; Fonseca et al., 2002; Oba-Shinjo et al., 2006; Peretti et al., 2008). Além disso, heparanase é ativada pela catepsina L, protease produzida em grande quantidade em metástase, implicando na disseminação celular, angiogênese e inflamação (Arvatz et al., 2011).

No molusco *Tagelus gibbus*, foi observada a degradação de heparam sulfato por duas sulfatases e uma β -endoglucuronidase, que fragmentam o polímero a oligossacarídeos N-sulfatados. Estes são então degradados pela ação alternada de α -N-sulfoglucosaminidases ou α -N-acetil glucosaminidases e glicuronidases (iduronidase e glucuronidase) (Souza, 1985; Medeiros, 1993; Nader et al., 1993). Com o molusco *Mesoderma donacium* e *Anomalocardia brasiliensis* observou-se a presença de 2-O-sulfoglicuronato sulfatase, 6-O-sulfoglucosaminil sulfatase e uma glucuronidase envolvidas na degradação de heparam sulfato (Abreu, 1994). Uma endoglucuronidase, que age sobre a região N-acetilada e N-sulfatada de heparam sulfato no embrião do molusco *Pomacea* sp., foi isolada e caracterizada (Oliveira et al., 1994).

Em 2004, Kasevayuth & Yanagishita, estudando o catabolismo de proteoglicanos de HS de células de *Drosophila*, concluíram haver similaridade entre os mecanismos catabólicos deste indivíduo com os de vertebrados, sugerindo um mecanismo comum de degradação GAGs em vertebrados e invertebrados.

4.2. Procariotos

Flavobacterium heparinum, também denominada *Pedobacter heparinum*, *Cytophaga heparina* e *Sphingobacterium heparinum*, é uma bactéria de solo gram-negativa, não patogênica, aeróbica facultativa, imóvel e não formadora de esporos, que, na presença de heparina, heparam sulfato ou seus dissacarídeos

como única fonte de carbono e nitrogênio, é capaz de produzir enzimas que degradam glicosaminoglicanos (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Nader et al., 1990). Payza e Korn (1956) foram pioneiros na análise do extrato bruto de *F. heparinum*, observando atividade de uma glicosidase, pelo aumento de grupos redutores em relação ao tempo; uma sulfamidase, pelo aumento de amino-açúcares; e uma sulfoesterase, pelo consumo de periodato pelos grupos redutores. Os autores verificaram que as enzimas tinham temperatura ótima de degradação em torno de 25 a 30° C e eram inativadas a 40° C.

Em 1957, Hoffman et al. demonstraram que o extrato de *F. heparinum* induzido com heparina não degradava heparina e heparam sulfato dessulfatados, sugerindo que o grupo N-sulfato era essencial para a quebra da ligação glicosídica.

A degradação da heparina com o extrato bruto induzido de *F. heparinum* gera uma série de produtos, como glucosamina e glucosamina N-sulfato, identificados por Linker e Sampson (1960). A identificação desses dois compostos sugeria, na época, duas hipóteses: ou estes açúcares faziam parte da molécula intacta da heparina e seriam liberados pela ação das heparinases presentes no extrato cru da *F. heparinum*; ou então poderiam ser originados de um dos produtos de degradação da heparina isolados em maior quantidade, a glucosamina 2,6-dissulfato, por uma degradação enzimática secundária. A segunda hipótese foi confirmada e os produtos de degradação da heparina foram descritos como sendo: glucosamina; glucosamina N-sulfato; glucosamina 2,6-dissulfato; dois dissacarídeos, sendo um deles dissulfatado e o outro, trissulfatado; um tetrassacarídeo sulfatado e um hexassacarídeo sulfatado (Dietrich, 1968). O isolamento desses compostos indicava um padrão de degradação com a participação de, no mínimo, quatro enzimas: uma que degradasse heparina a oligo- e dissacarídeo (glucosaminidase ou heparinase), outra que degradasse dissacarídeos a monossacarídeos (glicuronidase), e finalmente sulfatases que removessem grupos N-sulfato (sulfamidase) e O-sulfato (sulfoesterase) da molécula (Dietrich 1969a, b). Além dessas enzimas, uma segunda sulfoesterase foi identificada. Esta enzima converte dissacarídeo trissulfatado em dissacarídeo dissulfatado, removendo o sulfato do ácido urônico, e não age sobre glucosamina 2,6-dissulfato. A Tabela II resume os

primeiros achados sobre as cinco classes de enzimas encontradas no extrato cru de *F. heparinum* induzida com heparina.

Tabela II. Exosaminidases e Sulfatases de *F. Heparinum* induzida por heparina.

Enzima	Substrato	Produtos de degradação	Temperatura ótima	Km (10^{-4} M)	pH ótimo
Heparinase	Heparina	Δ Oligossacarídeos e Δ dissacarídeos sulfatados	30° C	-	7.5
Dissacarídeo sulfoesterase	Δ Dissacarídeo trissulfatado	Δ dissacarídeo dissulfatado	-	-	-
Glicuronidase	Δ Dissacarídeos dissulfatados	Monossacarídeos sulfatados; α,β -cetoácidos	30° C	-	6.5
6-O-Sulfoesterase	Glucosamina 6-sulfato; Glucosamina 2,6-dissulfato	Glucosamina Glucosamina N-sulfato	45° C	0,8	7.0
Sulfamidase	Glucosamina N-sulfato; Glucosamina 2,6-dissulfato	Glucosamina Glucosamina 6-sulfato	25° C	1,3	7.0

Fonte: Dietrich, 1968, 1969a,b.

Os produtos isolados por Dietrich (1969a,b) diferiram no comportamento cromatográfico e rendimento dos produtos descritos por Linker & Hovingh (1965). Esses últimos separaram duas enzimas de *F. heparinum*, uma delas capaz de degradar heparina a moléculas de baixo peso molecular que absorvem radiação UV e outra que converte esses produtos a monossacarídeos. Mais tarde foi averiguado que os autores não isolaram sulfoesterase de suas preparações, contaminando assim a amostra e o resultado final em produtos gerados.

Atualmente se sabe que a *F. heparinum* apresenta três sistemas enzimáticos: um constitutivo, com atividade sobre condroitim 4-sulfato,

condroitim 6-sulfato e ácido hialurônico (Yamagata et al., 1968); outro que degrada heparina e heparam sulfato, sendo induzido por estas moléculas ou por seus dissacarídeos constituintes (Dietrich et al., 1973); e um terceiro que degrada dermatam sulfato quando induzido por condroitim sulfato (Linker et al., 1960; Michelacci & Dietrich, 1973; Michelacci & Dietrich, 1975). Atividade de glucosaminidase e glicuronidase está presente em grande quantidade no extrato induzido, porém baixas quantidades destas atividades também foram encontradas no extrato não induzido. A indução das células aumenta em 20 vezes a produção dessas enzimas (Dietrich, 1969c).

O principal produto de degradação da heparina pela 2-amino-2-deoxy-D-glucosaminidase isolada foi um dissacarídeo trissulfatado de composição 4-O-(ácido α -L-idopiranosilurônico 2-sulfato)-(1 \rightarrow 4)-(2-deoxi-2-sulfoamino- α -D-glucopiranosil 6-sulfato) (Δ Ditri), a qual se apresentou em três quartos da molécula de heparina (Perlin, Mackie, & Dietrich, 1971), sendo 80% do total de produtos gerados. Ainda, os autores acharam que a insaturação dos compostos dissacarídicos e tetrassacarídicos encontrava-se entre os carbonos 4 e 5 do ácido urônico e o ácido α -L-idurônico 2-O-sulfatado era o componente do ácido urônico ligado à glucosamina-2,6-dissulfato na formação do dissacarídeo trissulfatado.

Em 1973, Dietrich, Silva e Michelacci demonstraram a degradação seqüencial da heparina por cinco enzimas purificadas de *F. heparinum* (Figura 12). Heparina é degradada a oligossacarídeos e dissacarídeo trissulfatado (Δ U,2S-GlcNS,6S) pela heparinase, que sofre ação da dissacarídeo sulfoesterase e forma dissacarídeo dissulfatado (Δ U-GlcNS,6S) e sulfato inorgânico (SO_4^{2-}). Dissacarídeo sulfoesterase é a enzima limitante na degradação da heparina. Δ U,2S-GlcNS,6S é um inibidor do primeiro passo de degradação da heparina e dessulfatação deste composto, originando Δ U-GlcNS,6S pela sulfoesterase, direciona a degradação em direção ao final. Δ U-GlcNS,6S é convertida à glucosamina 2,6-dissulfato pela ação da glicuronidase, que também libera α,β -cetoácido. Glucosamina 2,6-dissulfato pode sofrer ação da sulfamidase, produzindo glucosamina 6-sulfato e sulfato inorgânico; ou da monossacarídeo 6-O-sulfoesterase, produzindo glucosamina-

N-sulfato e sulfato inorgânico. Glucosamina 6-sulfato é substrato para monossacarídeo 6-O-sulfoesterase, originando glucosamina e sulfato inorgânico. Por sua vez, glucosamina-N-sulfato sofre ação da sulfamidase, produzindo glucosamina e sulfato inorgânico.

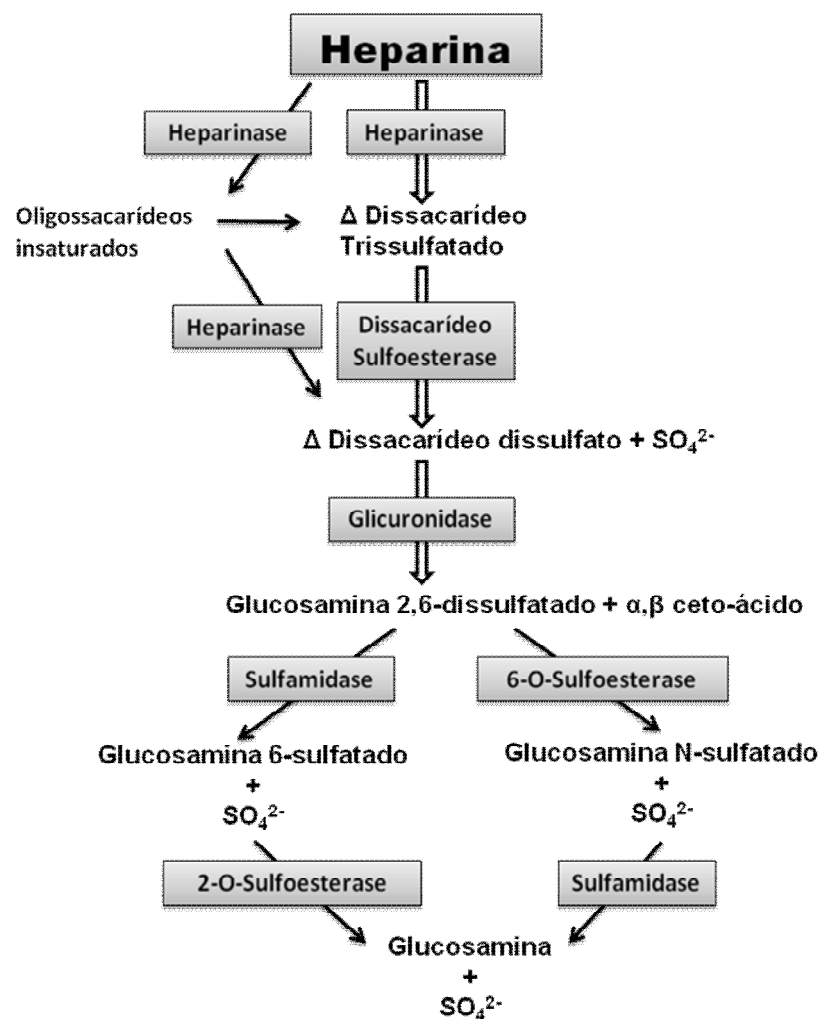


Figura 12. Esquema de degradação enzimática de heparina.

A glicuronidase clonada mostrou que a enzima hidrolisa ácido urônico $\Delta 4,5$ insaturado no terminal não redutor de oligossacarídeos resultantes primariamente da clivagem eliminativa de heparinases. Esta enzima discrimina o tipo de ligação glicosídica e o padrão de sulfatação de seus substratos. Assim, foi confirmado que se trata de uma hidrolase, que apresenta forte

preferência por ligações 1-4, tornando esta enzima específica para heparina e HS (Myette et al., 2002).

Em 1970, Hovingh & Linker fracionaram do extrato bruto de *F. heparinum*, duas atividades enzimáticas sobre heparina e heparam sulfato: a heparinase e a heparitinase. Em nosso laboratório foi descrita pela primeira vez uma segunda heparitinase. Dessa maneira, foi realizada a purificação parcial de uma heparinase e de duas heparitinases, denominadas heparitinase I (Htase I) e heparitinase II (Htase II) pela ordem decrescente de mobilidade eletroforética, em gel de agarose, com tampão etilenodiamino-acetato (EDA) (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Silva & Dietrich, 1974; Silva & Dietrich, 1975; Silva, Dietrich & Nader, 1976). O tampão EDA mencionado, na concentração 0,1M e pH 7,0, foi aquele que melhor conseguiu separar e estabilizar as enzimas.

Outros métodos foram descritos para purificação de heparinase: cromatografia em hidroxiapatita (Linker & Hovingh, 1972; Yang et al., 1985) e uso de anticorpos monoclonais (Linhardt, Merchant & Persinger, 1985).

Nader et al (1990) purificaram heparinase, Htase I e Htase II por cromatografias de troca iônica em DEAE celulose, gel filtração em Bio-Gel A-0,5m de 200-400 mesh e troca iônica em CM-celulose, empregando tampão EDA.

Em 1992, Loochse & Linhardt purificaram e caracterizaram três enzimas, denominando-as heparina liase I (EC 4.2.2.7, heparinase), heparina liase II (sem número) e heparina liase III (EC 4.2.2.8). No ano seguinte, Desai, Wang & Linhardt (1993) mostraram que as heparinas liases I e III apresentaram algumas semelhanças com heparinase e Htase I purificadas em nosso laboratório, respectivamente, no que se refere ao sítio de quebra, porém, a heparina liase III diferia da Htase I descrita por Nader et al. (1990), cujo trabalho demonstrou que o sulfato na posição C6 do HS é impeditivo para a ação desta última.

Heparinase e heparitinases I e II clivam, por mecanismo eliminativo, heparina e HS. São, portanto, ferramentas importantes na elucidação da relação estrutura-função de seus substratos. Além da *Flavobacterium heparinum*, as três

enzimas têm sido purificadas de outras bactérias, incluindo, *Prevotella heparinolytica*, *Bacteróides stercoris* e *Bacillus circulans*.

O mecanismo eliminativo consiste em clivagem da ligação oxigênio-aglicona, com perda de água, quando o próton é neutralizado, por enzima ou base inorgânica. O mecanismo geral para polissacarídeos liases pode ser dividido em três etapas:

- Remoção da carga negativa do ânion carboxilato;
- Abstração de um próton C-5 do uronato catalisada por uma base;
- β -eliminação da ligação glicosídica e protonação do oxigênio livre em C-1.

Assim, o grupamento carboxílico dos ácidos urônicos no carbono adjacente ao da ligação glicosídica eleva o caráter ácido do seu próton. O hidrogênio ligado ao carbono 5 torna-se susceptível a um ataque nucleofílico. Como produtos tem-se um ácido urônico α , β insaturado (C4-C5) no terminal não redutor e um hemiacetal no terminal redutor da ligação glicosídica (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Silva & Dietrich, 1974; Silva, Dietrich & Nader, 1976; Markowitz et al., 1982; Albersheim et al., 1986; Kennedy & White, 1983). Tal mecanismo ocorre tanto por ação enzimática (liases) quanto quimicamente em meio básico (Figura 13).

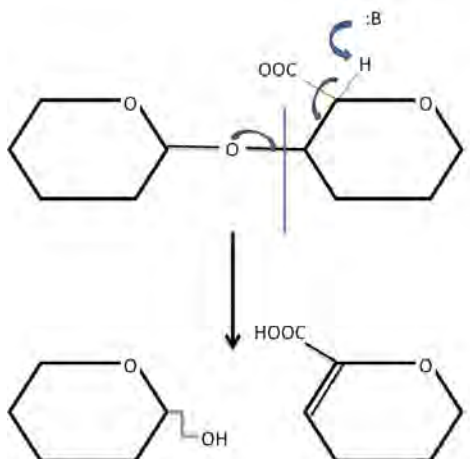


Figura 13. Mecanismo eliminativo para degradação de polissacarídeos ácidos.

Htase I e II degradam totalmente o heparam sulfato a quatro dissacarídeos com insaturação entre os C4 e C5. Htase I degrada o HS a dissacarídeo N-acetilado (Δ U-GlcNAc) e N-sulfatado (Δ U-GlcNS) e um oligossacarídeo de peso molecular entre 4,5-6 kDa; Htase II degrada totalmente este oligossacarídeo, liberando dissacarídeo dissulfatado (Δ U-GlcNS,6S), dissacarídeo N-acetilado 6-sulfatado (Δ U-GlcNAc,6S), Δ U-GlcNS e traços de Δ U-GlcNAc. Sulfatação no C6 do resíduo de glucosamina é impeditivo para a atividade da Htase I. Além disso, Htase II requer pelo menos uma sulfatação no C2 ou no C6 em resíduos de glucosamina, para a sua atividade. Ainda, 2-O-sulfatação nos resíduos de ácido idurônico é impeditivo para atividade da Htase II. Esta última, por sua vez, age sobre substratos com 2-O-sulfatação em resíduos de ácido glucurônico. Sulfatação no C3 do ácido glucurônico torna o substrato resistente a Htase II (Nader et al., 1990; Nader et al., 1999).

A terceira enzima induzida é a Heparinase, que, juntamente com a Htase II, degrada heparina. Heparinase reconhece as ligações glicosídicas do tipo α (1-4) entre os resíduos de glucosamina N-sulfatada e ácido L-idurônico 2-O-sulfatado, produzindo tetrassacarídeos insaturados pentassulfatados (Δ U,2S-GlcNS,6S-GlcUA-GlcNS,6S) e dissacarídeo insaturado trissulfatado (Δ U,2S-GlcNS,6S). Então, a Htase II cliva o tetrassacarídeo, como mostra a Figura 14 (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Silva & Dietrich, 1974; Silva, Dietrich & Nader, 1976).

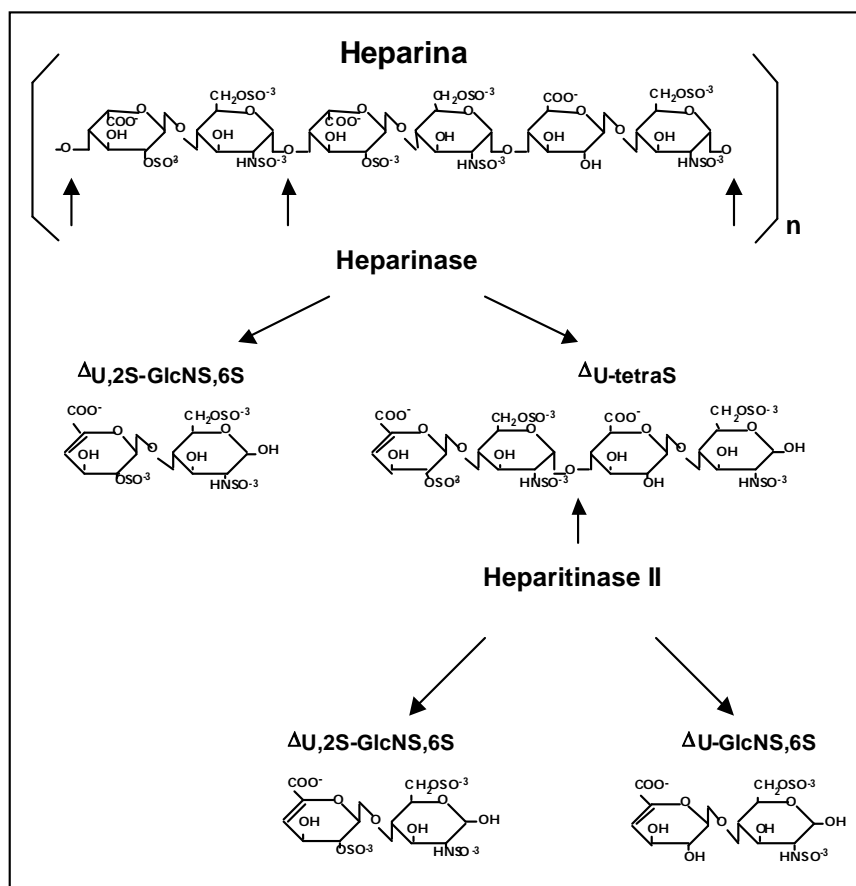


Figura 14. Mecanismo de ação da heparinase sobre a heparina e heparitinase II sobre os produtos de degradação da heparina.

A Figura 15 apresenta um esquema geral da degradação de um GAG hipotético pela heparinase e heparitinas.

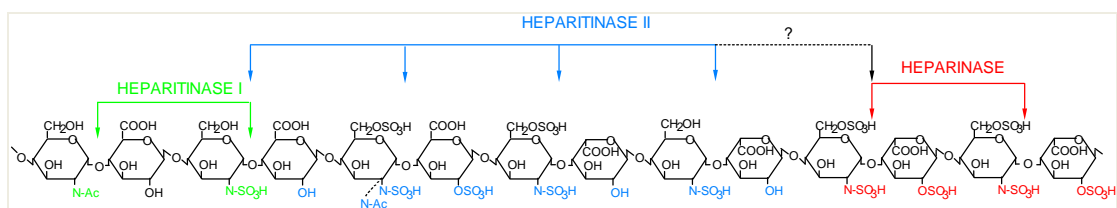


Figura 15. Modo de ação de heparam sulfato e heparina liases sobre um glicosaminoglicano hipotético.

Heparinase e heparitinases já tiveram seus genes clonados e expressos em *E. coli* e suas sequências primárias não apresentaram similaridade, com especificidades distintas (Yoshida et al., 2002; Sasisekharan et al., 1993; Su et al., 1996; Godavarti et al., 1996; Godavarti & Sasisekharan, 1996). Godavarti & Sasisekharan (1996) observaram que a heparinase e heparitinase II produzem dois dissacarídeos di- e trissulfatados com o mesmo tempo de eluição, quando clivam a heparina. A análise das sequências primárias das três enzimas revelou que heparinase apresenta dois sítios de ligação ao substrato (heparina) rico em histidina (carga positiva) e um de ligação ao cálcio, e também um resíduo de cisteína. Heparitinase II apresenta dois sítios de ligação ao substrato (heparina/heparam sulfato), três resíduos de cisteína, mas não apresenta sítio de ligação ao cálcio. Já, a heparitinase I não apresenta cisteína, mas têm dois sítios de ligação ao cálcio e dois de ligação ao substrato (heparam sulfato) (Godavarti & Sasisekharan, 1996). Cisteína e histidina parecem ser essenciais para a atividade da heparinase (Godavarti et al., 1996; Godavarti & Sasisekharan, 1998). Ainda, cálcio é essencial para a atividade da heparinase e heparitinase I, mas inibe a II. Nosso laboratório já descrevia, em 1973, a importância do uso de íons Mn^{+2} ou Ca^{+2} em ensaios com heparinase (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Silva & Dietrich, 1975).

Glicosilação é um fenômeno extremamente raro para procariotos. Foi observado em certas endoglicosidases de *Flavobacterium meningosepticum*. Godavarti & Sasisekharan (1996) sugeriram que as três enzimas sofrem modificações pós-traducionais, baseados nos perfis de purificação da heparinase e heparitinase II, que mostravam ter múltiplas isoformas. Além disso, a análise de suas sequências primárias revelou que o aminoácido na região N-terminal das enzimas é bloqueado, sugerindo modificação pós-traducional. Htase I não apresentou isoformas. Heparinase é processada pós-traducionalmente pela clivagem de uma sequência líder (resíduos 1-21), pela conversão da glutamina-22 N-terminal para piroglutamato e pela O-glicosilação da serina 39 (peso molecular do carboidrato de 1.1 kDa). Htase II sofre conversão da glutamina 26 em piroglutamato e O-glicosilação da serina 601 (peso molecular do carboidrato 1.3 kDa). Htase I sofre conversão da glutamina

25 em piroglutamato e não sofre O-glicosilação (Godavarti & Sasisekharan, 1996). A glicosilação não foi descrita posteriormente por outros autores.

5. Heparinase

Devido a sua complexidade estrutural, massa molecular (em torno de 12000) e por ser uma molécula polidispersa (5000-40000), a determinação direta da estrutura da heparina não é possível. Uma abordagem comum é quebrar a heparina primeiramente a pequenos oligossacarídeos usando métodos químicos e enzimáticos e caracterizar suas estruturas. Para isso, uma importante ferramenta de quebra específica da heparina é a heparinase (Nader et al, 1990; 1999b; Dietrich et al, 1998; Xiao et al., 2011).

Heparinase apresenta importantes aplicações clínicas, como monitoramento e neutralização de níveis de heparina no sangue, bem como, a produção de heparina de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight Heparin* – LMWH) para uso em humanos. Ainda, esta enzima, juntamente com heparitinase I, mostrou ser um potente inibidor de angiogênese (Liu et al., 1999; Sasisekharan et al., 1994; Xiao et al., 2010; Xiao et al., 2011). Logo, tanto para análise estrutural da heparina, como em aplicações clínicas, o estudo da estrutura e do comportamento catalítico da heparinase tem despertado grande interesse, sendo clonada e expressa por diversos grupos de pesquisa.

A especificidade da heparinase foi investigada empregando-se heparinas quimicamente modificadas e heparosam (K5 de *E. coli*) com diferentes sulfatações (Nader et al., 1999b). Os resultados mostraram que a enzima cliva exclusivamente ligações contendo glucosamina N-sulfato e ácido- α -L-idurônico 2-O-sulfato. A glucosamina pode ou não estar sulfatada em C3 e/ou C6. No entanto, o resíduo de ácido idurônico deve estar sulfatado em C2. Outro estudo de especificidade foi realizado pelo tratamento exaustivo da heparina com heparinase (Xiao et al., 2011). Preferencialmente, longos oligossacarídeos (dp \geq 8) são formados, tendo a sequência do terminal redutor de –GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S idêntica à presente no terminal redutor do hexassacarídeo, e esses longos oligossacarídeos (dp \geq 8) são ainda sensíveis à

mesma enzima e podem ser degradados a hexassacarídeo em tratamentos enzimáticos prolongados. Os oligossacarídeos gerados podem ser divididos em três grupos: dissacarídeo $\Delta\text{UA}2\text{S-GlcNS}6\text{S}$, tetrassacarídeo $\Delta\text{UA}2\text{S-GlcNS}6\text{S-GlcA-GlcNS}6\text{S}$ e hexassacarídeo $\Delta\text{UA-GlcNS}6\text{S-IdoA-GlcNAc}6\text{S-GlcA-GlcNS}3\text{S}6\text{S}$. Estudos composicionais revelaram que heparinase cliva heparina em dois sítios: $\text{GlcNS}6\text{S} (1\rightarrow4) \text{IdoA}2\text{S}$ e $\text{GlcNS}3\text{S}6\text{S} (1\rightarrow4) \text{IdoA}2\text{S}$. O segundo sítio é o já conhecido dissacarídeo presente na região de ligação da heparina à AT, o qual é mais susceptível à clivagem com heparinase do que o primeiro sítio. Por isso, heparinase não é útil para preparar oligossacarídeos que contenham a sequência intacta pentassacarídica de ligação a antitrombina. Assim, heparinase é uma enzima randômica e endolítica que preferencialmente cliva ligações $\text{GlcNS}3\text{S}6\text{S} (1\rightarrow4) \text{IdoA}2\text{S}$ e que a distribuição dessas ligações dentro da molécula de heparina promove diferentes sensibilidades à enzima (Xiao et al., 2011).

O excesso de heparina no sangue pode ser revertido pela administração de protamina, complexo protéico de baixa massa molecular, carregado positivamente devido ao seu elevado teor de arginina (67%). A protamina se complexa eletrostaticamente com heparina e forma um complexo estável desprovido de atividade anticoagulante (Ando, et al., 1973; Chargaff, & Olson, 1937). Protamina, contudo, causa alguns efeitos colaterais, que podem ser desde uma modesta elevação da pressão sanguínea até uma severa resposta alérgica ou um acidente vascular cerebral. Enquanto a heparina íntegra é facilmente neutralizada por protamina, as LMWHs são neutralizadas de modo incompleto. A heparinase mostrou neutralizar eficientemente LMWHs e também oligossacarídeos de heparina ainda menores (dp4-10). Um importante exemplo disso é o pentassacarídeo sintético de heparina, que tem sido clinicamente avaliado na Europa para ser usado como fármaco, pois é um agente específico para catalisar a inibição de fator Xa via AT. Este composto é facilmente depurado da circulação com o uso de heparinase, porque possui o sítio de clivagem específico desta enzima (Yu et al., 2000).

Sasisekharan et al. (1995) identificaram o resíduo de cisteína 135 da heparinase como essencial para a atividade catalítica desta enzima. Godavarti et al. (1996) observaram que a histidina 203 não só participava do sítio de

ligação à heparina, mas também seria importante para catálise. Os autores propuseram que o ambiente básico do sítio ativo da heparinase tenderia a baixar o pKa do grupo tiol de Cys 135, facilitando a sua desprotonação e fazendo com que este resíduo atuasse como uma base para a abstração de próton. His 203 promoveria, então, a reatividade da Cys 135, agindo como ácido/base catalisador na abstração e doação de prótons. Assim, ou a His 203 agiria como nucleófilo primário, abstraindo o próton do substrato, ou ativaria Cys135 para catálise, operando como parte do sistema de manutenção do microambiente carregado.

Em 1998, Godavarti & Sasisekharan propuseram que o sítio de ligação à heparina carregado positivamente gera um microambiente que estimula a atividade catalítica de Cys 135, e que cisteína e histidina fazem parte do domínio catalítico da enzima. Estes autores investigaram a participação de Lys 199 como ácido, para estabilizar a carga negativa do ânion carboxilato, e também sua participação na manutenção do microambiente positivo que baixa o pKa de Cys135. Os resultados sugeriram a participação de três aminoácidos na catálise: Cys135, His203 e Lys 199. Foi verificado que Lys 199 estabilizaria um ânion, que poderia ser do carboxilato do ácido urônico, ou do grupo tiol da Cys 135.

Liu et al. (1999), para identificar os resíduos de ligação da heparinase ao íon cálcio (Ca^{2+}) e entender sua importância para a catálise da enzima, realizaram mutações em dois sítios de ligação de cálcio, CB-1 (*calcium binding site 1* - resíduos 207-219) e CB-2 (*calcium binding site 2* - resíduos 373-384), baseados na sequência de aminoácidos. CB-2 mostrou ter uma função mais proeminente na atividade da heparinase, pois, mutações em CB-2 diminuíram drasticamente (10 vezes) a atividade enzimática, enquanto que em CB-1 a diminuição foi de, no máximo, 5 vezes. Mesmo com a perda da ligação do Ca^{2+} à enzima, heparinase foi capaz de se ligar à heparina. Estudos de dicroísmo circular revelaram que a ligação de Ca^{2+} não muda a conformação da enzima. A primeira possibilidade de participação do Ca^{2+} na catálise sugerida pelos autores é que um cátion poderia interagir diretamente com os grupos carboxílicos aniônicos do substrato e diminuir suficientemente o pKa do carbono ácido de tal forma que a abstração do próton- α pudesse ser realizada

por um aminoácido básico da enzima. Portanto, os autores propuseram que, em heparinase, Cys135 existiria como um ânion tiolato no sítio ativo da enzima e iniciaria a abstração do próton do C5 do uronato. Em adição, His203 e Lys199 realizariam a função de catálise. Ca^{2+} atuaria como um ácido de Lewis. Alternativamente, Lys199 atuaria como um ácido catalisador ao protonar o oxigênio da carbonila do grupo carboxila, e Ca^{2+} poderia agir como estabilizador da Lys199 ou Cys135 desprotonada. A polarização do grupo carboxila pelo Ca^{2+} ou Lys199 acidificaria o próton- α de C-5, facilitando sua abstração por Cys135. Histidina poderia agir como um segundo ácido catalisador para protonar o β -substituinte livre.

A estrutura da heparinase de *Bacteroides thetaiotaomicron* foi recentemente determinada por estudos de difração de raios-X (Han et al., 2009). A enzima foi analisada no estado livre e complexado com produtos dissacarídicos de heparina (HE2), substratos tetrassacarídicos (HE4), e mutante inativa H151A complexado com o dodessacarídeo (HE12). A enzima é composta por um domínio de β -barril (β -jellyroll) formado por duas folhas β côncavas (8 fitas- β antiparalelas cada) com uma dobra glucanase e um domínio de inserção *thumb-like* (“domínio *Thumb*,” em forma de dedo – resíduo 156-221) estendido para um lado do β -barril. Uma pequena extensão forma um *loop* (dobra) (resíduo 92-118) com uma α -hélice imersa. A folha interna do β -barril é fortemente curvada, formando uma longa e estendida garganta (*cânion*). Este tubo é positivamente carregado em seu interior, provendo um sítio de ligação a heparina. Além disso, o domínio *Thumb* é carregado positivamente, na face virada para o *cânion*, e parece para facilitar a ligação da heparina. O *cânion* é parcialmente coberto por uma “tampa” formada por 2 loops, Gly74-Glu79 e Thr250-Asn257 do domínio β -barril e Lys184-Val187 do domínio *Thumb* (Han et al., 2009) (Figura 16).

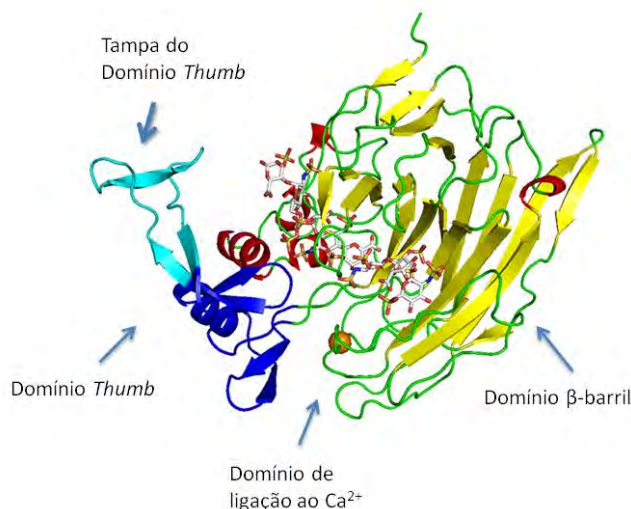


Figura 16. Esquema do complexo Heparinase – dodecassacarídeo de heparina, mostrando os principais domínios da enzima.

Fonte: Han et al., 2009, adaptado.

Íons Ca^{2+} garantem a integridade estrutural da heparinase, que se liga a uma região de dobradiça entre o domínio β -barril e o domínio *Thumb* e é coordenado por cadeias laterais. A ligação do substrato envolve muitas pontes de hidrogênio diretamente ou mediada por água, entre os grupos sulfato e hidroxilas do substrato e o lado básico da cadeia dentro do *cânion*. Quando o cristal é obtido com substrato dodecassacarídeo, o grupo carboxílico do ácido urônico na posição +1 (Figura 17) é o que está mais firmemente ligado à enzima, formando duas pontes de hidrogênio com a cadeia lateral de Gln149 e uma terceira ponte com Arg83 (Han et al., 2009).

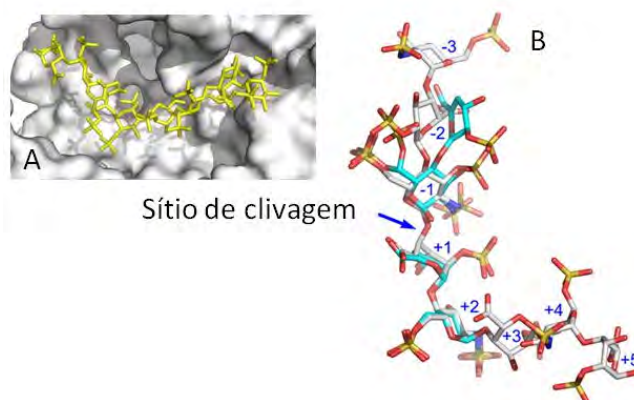


Figura 17. Esquema da ligação de heparina dentro do sítio ativo de Heparinase.

A. Dodessacarídeo de heparina no sítio ativo de heparinase. **B.** Superposição de tetrassacarídeo de heparina (esqueleto carbônico azul) e dodecassacarídeo (esqueleto carbônico branco) no sítio de ligação da enzima. Subsítios -3, -2, -1, +1, +2 e +3 indicam a posição dos monossacarídeos no sítio de clivagem, sendo -1 e +1 o local da clivagem eliminativa. Fonte: Han et al., 2009, adaptado.

Para que o substrato se encaixe dentro do sítio de ligação da enzima, o longo polissacarídeo faz uma dobra justa de 90° centrado em GlcNAc ao lado. Essa dobra é necessária para acomodar uma longa cadeia e permitir os açúcares +3 e +4 emergir na superfície da proteína (Han et al., 2009).

O tetrassacarídeo clivado preso à enzima apresenta uma insaturação entre C4-C5 no açúcar no sub-sítio +1 (ácido urônico insaturado), fazendo com que este anel assumira a conformação de uma meia-cadeira (*half-chair*). A densidade eletrônica para os produtos no sub-sítio (+) é mais fraca do que para os sub-sítios (-), sugerindo uma baixa ocupação do sub-sítio (+). Após a quebra da ligação, os produtos no terminal redutor do polissacarídeo e ocupando o sub-sítio (+) deixam a enzima primeiramente (Han et al., 2009).

Heparinase requer no mínimo 6 unidades de açúcar para uma catálise eficiente e tem preferência por polissacarídeos longos, segundo dados cinéticos: a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) foi 4,5 vezes maior para

polissacarídeos com 20 unidades em comparação com hexassacarídeos. Longos polissacarídeos apresentaram baixo k_{cat} , mas foi compensado pelo K_M 12 vezes mais baixo em comparação com oligossacarídeos (Han et al., 2009).

Para estudo da função do domínio *Thumb*, os autores produziram duas mutações por deleção: uma do domínio inteiro ($\Delta 156-221$), e outra da região da ponta triangular (tampa) do domínio ($\Delta 191-213$) (Figura 16). Na primeira mutação, a enzima perdeu a região de ligação ao Ca^{2+} e não foi capaz de ligar oligossacarídeos de heparina, confirmando a função do Ca^{2+} em organizar os resíduos que participam da ligação do substrato. Na segunda deleção a enzima não perdeu atividade, mas sua eficiência catalítica sobre heparina acima de 20 unidades foi 380 vezes menor e, sobre substrato hexassacarídeo, 480 vezes menor. Uma característica desta região terminal do domínio *thumb* é seu campo eletrostático fortemente positivo, contribuindo para afinidade de substrato carregado negativamente. Esta condição é perdida na mutação $\Delta 191-213$, explicando, segundo os autores, a diminuição de ambos K_d e K_m para oligossacarídicos curtos (hexassacarídeos) (Han et al., 2009).

Por meio de mutações pontuais, Han et al. (2009) sugeriram um modelo de catálise para heparinase de *Bacteroides thetaiotaomicron*. A neutralização do grupo carboxilato do ácido idurônico no sub-sítio +1 é realizada pela interação do substrato com Gln149 e Arg83; as duas pontes de hidrogênio formadas com Gln149 resulta em estabilização da ressonância da forma enolato, baixando o pKa de C5-ponte de hidrogênio. Lys353 realiza interação por carga com o grupo sulfato de GlcNAc no sub-sítio +2, além de uma interação adicional com o grupo carboxilato do ácido urônico no sub-sítio +1. A função de base geral, abstraindo o próton de C5, é realizada por His151. A cadeia lateral de histidina está face a face com o próton de C5 de IdoA no sub-sítio +1 e seu átomo de $N\epsilon 2$ está 3.0 Å de distância do C5, colinear com C5-ponte de hidrogênio (~2.0 Å do próton). A abstração do próton leva à β -eliminação da ligação glicosídica 1 \rightarrow 4, com a concomitante formação da dupla ligação entre C4-C5 no ácido urônico no terminal não redutor. Finalmente, o grupo hidroxila da Tyr 357 faz uma ponte de hidrogênio com o oxigênio na ligação glicosídica e o grupo hidroxila de C1 do sub-sítio -1 da GlcNAc em HE4 respectivamente. Tyr 357 assume a função geral dos ácidos, doando um próton

para o grupo O- da glucosamina, reconstituindo o grupo hidroxila do terminal redutor. Para que a tirosina funcione como ácido, doando um próton, seu pKa deve baixar no ambiente local. Os autores sugerem que Lys 81 reduza o pKa da Tyr 357, através de uma ponte de hidrogênio (Figura 18) (Han et al., 2009).

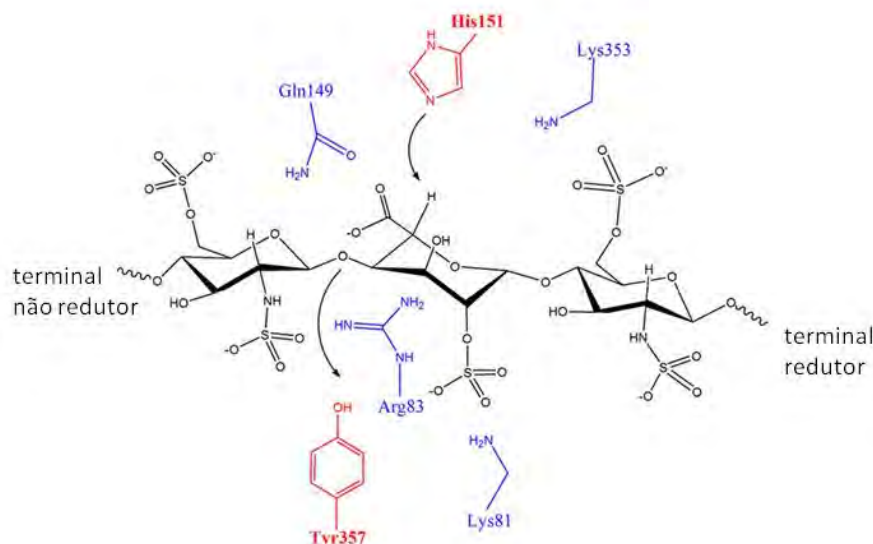


Figura 18. Esquema do mecanismo de catálise de Heparinase de *Bacteroides thetaiotaomicron*.

His151 se comporta como base ao abstrair o próton de C5 do ácido idurônico no subsítio +1; Tyr357 age como ácido doando um próton ao terminal redutor da glucosamina no subsítio -1. Gln149 neutraliza o grupo carboxila de IdoA no subsítio +1. Fonte: Han et al., 2009, adaptado.

O mecanismo de ação da heparinase proposto por Han et al. (2009) vai de encontro com resultados obtidos por Sasisekharan et al. (1995) no que se refere à participação do resíduo de Cys 135 como base, capaz de abstrair o próton de C-5 e iniciar a clivagem eliminativa.

Os cristais de Heparinase de *Bacteroides thetaiotaomicron* e heparitinase II de *Flavobacterium heparinum* apresentaram diferentes arquiteturas, mas similaridade no arranjo de seus resíduos catalíticos. A superposição de seus sítios catalíticos mostrou a posição da His 151 e Tyr 357 da heparinase sobre a His 202 e a Tyr 257 da heparitinase II. O grupo ácido do ácido urônico forma pontes de hidrogênio com Gln 149 e Lys 353 na heparinase e Glu 205 e Arg 261 na heparitinase II. Essas duas estruturas

representam um exemplo claro de convergência de duas conformações em direção ao mesmo sítio catalítico e mecanismo enzimático muito similar (Han et al., 2009; Shaya et al., 2006; Shaya, et al., 2010).

Diante da importância da heparinase para estudo estrutural da heparina e das diversas aplicações clínicas envolvendo essas duas moléculas relatadas neste trabalho, e ainda tendo em mãos os dados das propriedades da heparinase produzidos ao longo dos anos na corrida pela elucidação de sua conformação e mecanismo de ação, este trabalho faz um estudo cinético da heparinase de *Flavobacterium heparinum*, para a exploração do comportamento da enzima sob efeito de diferentes condições de catálise, como pH, temperatura, modificação química do substrato, inibidor, entre outros.

JUSTIFICATIVA

GAGs apresentam diversas funções desde espongiários até mamíferos superiores. O uso das enzimas que degradam GAGs é uma ferramenta de extrema importância para o estudo estrutural desses açúcares e a elucidação de suas funções. Heparinase e heparitinase I e II são largamente utilizadas em nosso laboratório para caracterização dos GAGs encontrados em diversos tecidos e espécies. Essas enzimas são produzidas no próprio laboratório por extração da *Flavobacterium heparinaum* induzida ou produção por clonagem e expressão da enzima recombinante.

A heparina desempenha uma variedade de funções farmacológicas e biológicas dependentes da estrutura dessa molécula. Na indústria farmacêutica, é a droga anticoagulante mais usada a mais de 75 anos, essencial em cirurgias de grande porte, além do tratamento de doenças tromboembólicas e distúrbios da coagulação. Heparinase é uma ferramenta de estudo específico da heparina, proporcionando grandes avanços na elucidação de sua estrutura, num primeiro momento, e dos mecanismos pelos quais a heparina interage com moléculas, baseados em sua estrutura, interferindo, portanto, em processos biológicos.

Além de importante ferramenta de pesquisa para GAGs, heparinase e heparitinases têm mostrado apresentar diversas aplicações clínicas na indústria farmacêutica, como atividade antiangiogênica (Sasisekharan et al., 1994), produção de heparinas de baixo peso molecular (Nader et al., 1999b; Dietrich et al., 1999b; Xiao et al., 2010), depuração de heparina no sangue de pacientes submetidos a hemodiálise ou a circulação extracorpórea (Linhardt et al., 1984; Xiao et al., 2011), entre outras. Assim, o entendimento da estrutura e do mecanismo de ação dessas liases é essencial para compreender sua especificidade sobre os GAGs e usá-las clinicamente em seres humanos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Clonar e expressar heparinase e heparitinase I de *Flavobacterium heparinum*, assim como estudar o mecanismo de ação da heparinase por métodos cinéticos e mutagênicos.

Objetivos específicos

1. Clonar e expressar a Heparinase e Heparitinase I de *Flavobacterium heparinum*, enzimas específicas na degradação da heparina e do heparam sulfato, respectivamente;
2. Purificar as enzimas nativas e recombinantes de *Flavobacterium heparinum*, comparando suas atividades específicas;
3. Estudar o comportamento enzimático da Heparinase e Heparitinase I, variando condições de ensaio e parâmetros da cinética enzimática;
4. Analisar os grupamentos catalíticos que participam do sítio ativo da Heparinase pela influência do pH e mutação sítio dirigida sobre a catálise;
5. Estudar o efeito inibitório do condroitim sulfato supersulfatado sobre Heparinase;
6. Estudar a especificidade da Heparinase;
7. Propor um modelo de ação catalítica para Heparinase.

MATERIAIS

1. Microorganismos

- *Flavobacterium heparinum* - American Type Culture Collection - 13125 (Rockville, ML, EUA);
- *Escherichia coli* DH5 α , células competentes; *Escherichia coli* BL21(DE3), células competentes; *Escherichia coli* Rosetta-gami(DE3) pLysS, células competentes - Novagen (Darmstadt, Alemanha).

2. Meios de cultura

- Bacto ágar - Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA);
- Extrato de triptona - Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA) e Himedia Laboratories (Mumbai, Índia);
- Peptona e glicose - Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Trypticase e extrato de levedura - BD (Franklin Lakes, NJ, EUA).

3. Glicosaminoglicanos

- Heparina (Hep) extraída de mucosa intestinal e pulmão bovino foram fornecidas pela Laob, Laboratório Opoterápico (Barueri, SP, Brasil) e também pelo Dr. P. Bianchini (Opocrin Research Laboratories, Modena, Itália);
- Heparan sulfato (HS) de pâncreas bovino foi preparado como descrito (Dietrich & Nader, 1974);
- Condroitim sulfato AC de traquéia bovina foi extraído em nosso laboratório (Mourão et al., 1976);
- Condroitim sulfato supersulfatado foi gentilmente cedido pelo Prof. Jawed Fareed da Loyola Medical Center (Maywood, IL, EUA);
- Dermatan sulfato extraído de pele de porco foi adquirido da Seikagaku Kogyo Co. Lto (Tóquio, Japão).

4. Enzimas

- Extrato bruto da *Flavobacterium heparinum* induzido com heparina foi preparado conforme descrito em Dietrich (1969c).
- Heparinase foi purificada a partir do extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* de acordo com Nader et al. (1990).
- Proteinase K - Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

5. Resinas

- Zorbax SAX 4.6 x 150 mm, partícula de 5 µm - GE-Healthcare (Uppsala, Suécia);
- DEAE-Cellulose; Macro-Prep High Q Support (*Strong anion exchange*); DEAE Bio Gel - BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Ni-NTA Purification system, Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

6. Anticorpos

- Anti-His Antibody - GE-Healthcare (Uppsala, Suécia);
- Anticorpo secundário Goat Anti-mouse IgG, HRP conjugate, Millipore (Upstate) (Cork, Ireland).

7. Reagentes e outros materiais

Os reagentes utilizados em todos os experimentos foram P.A. (para análise), de acordo com as normas técnicas. A seguir, alguns dos reagentes específicos mais utilizados neste trabalho:

- 1,3-diaminopropano, 1,3-diaminoetano e ácido isobutírico; alcian blue 8GX - Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA);
- Acetona; acetato de sódio e hidróxido de sódio; brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon) - Merck (Darmstadt, Alemanha);

-
- Acrilamida e agarose (Standard Low-Mr) Ultra Pura e Triton X 100 - BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
 - Deuterium oxide 99,9%– CIL – Cambridge Isotope - Laboratories Inc. (Andover, MA, EUA);
 - Azul de toluidina - Fisher Scientific Co. (Fair Lawn, NY, EUA);
 - Caseína – leite Molico 5% - Nestlé S.A. (Suíça)
 - Centricon Ultracel YM – 10 membrane – 10,000 MNWL – Millipore (Cork, Ireland);
 - Coluna Zorbax SAX 4.6 x 150 mm, partícula de 5 µm; membrana de nitrocelulose; Vivaspin 20, 10.000 MWCO; Tris (tris(hidroximetil)aminometano) - GE-Healthcare (Uppsala, Suécia);
 - Kit SuperSignal RPA III Chemiluminescent detection – Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA).
 - N,N,N,N tetrametiletenodiamina (TEMED), nitrato de prata, N-N-metil bisacrilamida, Dietilpirocarbonato (DEPC), N-etilmaleimida (NEM), ditioneitol (DTT), 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA); Imidazol; HEPES e albumina bovina sérica (BSA) - Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA);
 - Papel Whatman nº1 - W&R Balston Ltd. (Maidstone, Inglaterra);
 - “Trizol^R Reagent” - Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

8. Materiais e reagentes para Biologia Molecular

8.1. Plasmídeos

- pET 14b - Novagen (Darmstadt, Alemanha);
- pET 26b - Novagen (Darmstadt, Alemanha);
- pGEM-T Easy - Promega (Madison, WI, EUA).

8.2. Reagentes e outros materiais

- Agarose; IPTG (isopropil tiogalactosídeo) - BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Ampicilina (amp), kanamicina (kan), cloranfenicol (cam), tetraciclina (tet) e brometo de etídeo - Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Benzamidina Hydrochloride- InLab (São Paulo, Brasil);
- dNTP - Fermentas (Letônia, EU);
- *Dynamic (terminator cycle sequencing ready reaction) DNA sequencing kit 3.0* com Taq DNA polimerase - Amersham Biosciences Corporation (Piscataway, EUA);
- Padrão de peso molecular de DNA (100pb e 1Kb DNA ladder) e de proteína - Fermentas Life Sciences (Letônia, EU);
- Placas de Petri de poliestireno, 100 x 15mm, sem tratamento; tubos arredondados para crescimento de bactéria; tubos cônicos 15 mL e 50 mL – BD Falcon™ (Franklin Lakes, NJ, EUA);
- *Platinum^R Taq DNA Polymerase High Fidelity* - invitrogen (Carlsbad, CA);
- *QIAprep Spin Miniprep e Plasmid Midi* - QIAGEN (C.A, EUA);
- *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* - Stratagene (C.A, EUA);
- *Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System* - Promega (Madison, WI, EUA).

8.3. Enzimas

- *Bam HI* e *Eco RI* - Gibco BRL (P.A., EUA);
- *XhoI* – Fermentas (Letônia, EU);
- *Nco I* - Gibco BRL (P.A., EUA);
- T4 DNA ligase - Promega (Madison, WI, EUA);

-
- Trombina – Amersham Pharmacia Biotech. AB. (Uppsala, Su);
 - Lisozima – Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

9. Equipamentos

Além dos equipamentos de uso rotineiro em laboratório, citamos em especial:

- Autoclaves vertical e horizontal da FABBE (São Paulo, SP, Brasil);
- Banhos e estufas de temperatura constante FANEM Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Câmara para eletroforese em gel de agarose e câmara para eletroforese preparativa, modelos desenvolvidos por Jaques et al. (1968), da Técnica Permatron Ltda (São Paulo, SP, Brasil) ;
- Centrífuga refrigerada CR20B2, da Hitachi (Tóquio, Japão);
- Coletor de frações – LK 20870 UltroRac II e LKB 2112 RedoRac - LKB Produkter Ab (Bromma, Suécia); coletor de frações Retriever IV - Isco Inc. (Lincoln, NB, EUA); coletor de frações Spectra/Chrom CG-1 - Spectrum (Houston, TX, EUA); coletor de frações Frac-920 - GE-Healthcare (Uppsala, Suécia);
- Densitômetro Quick Scan 2000 - Helena Laboratories (Beaumont, TX, EUA);
- Disruptor de células Ultrasonic Mixing Sonicador – Unique Group (Indaiatuba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro modelo U-2000 - Hitachi (Tokio, Japão);
- Espectrofluorímetro RF- 5301-PC - Shimadzu (Tokio, Japão);
- Fontes de corrente contínua regulável, adquiridas da LKB Producter (Bromma, Suécia) e desenvolvidas pela Técnica Permatron Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Incubadora, modelo G-25 - New Brunswick Scientific Co., Inc., (Edison, NJ, EUA);

-
- Incubator Shakers modelos Benchtop E24 e Large capacity Excella – New Brunswick Scientific Co., Inc (Edison, NJ, EUA);
 - Purificador de água Milli-Q™ ZD2- 115 84 - Millipore (Cork, Ireland);
 - SAX-HPLC, Cromatógrafo Äkta Purifier - GE-Healthcare (Uppsala, Suécia);
 - Sistema de eletroforese vertical, Modelo Protean II xi – BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
 - Termociclador Gene amp PCR system 2400 - Perkin Elmer (C. A, EUA);
 - Ultra-centrífuga, modelo CP70G - Hitachi (Tóquio, Japão).

MÉTODOS

1. Produção e purificação de heparinase e heparitinase I nativas de *Flavobacterium heparinum*:

1.1. Cultivo e indução de *Flavobacterium heparinum*

Flavobacterium heparinum foi mantida em meio sólido contendo ágar 1,2% e tripticase 2,7% em tubos de cultura estéreis, sendo mensalmente repicadas.

Para a produção de enzimas induzidas, *Flavobacterium heparinum* foi inoculada em 50mL de meio de cultura estéril contendo 1,0% de peptona e 0,25% de glicose, a 30°C, sob agitação a 100 r.p.m. até que a densidade ótica em 630 nm atingisse 0.250. A seguir, a suspensão de bactérias foi transferida para um litro de meio de indução estéril contendo 1,0% de peptona e 150mg/mL de heparina e a suspensão de células foi incubada a 30°C e 100 r.p.m. por 14 a 16 horas.

Após crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g, 4°C, por 20 minutos. O precipitado obtido foi lavado 2 vezes com 0,1 M de tampão etilenodiamino-acetato (EDA), pH 7,0, e ressuspenso em 10 mL do mesmo tampão. As células foram rompidas por congelamento/descongelamento e sonicação intermitente (4 °C, 80 mHZ, 5 ciclos de 30 seg, com 30 seg de intervalo) e centrifugadas a 10.000 X g, 4°C por 30 min. O sobrenadante foi então ultracentrifugado a 100.000 X g, 4°C por 1 hora, e o novo sobrenadante recolhido e denominado extrato bruto, armazenado a -20°C para posterior purificação.

Um estudo de indução feito em nosso laboratório analisou a taxa de expressão da heparitinase I pelo aumento de transcrição de RNAm que codifica para esta molécula (Figura 19) (Córdula, 2006). Os dados mostraram a produção basal desta enzima em células crescidas em meio não induzido, bem como o aumento da expressão da enzima após indução.

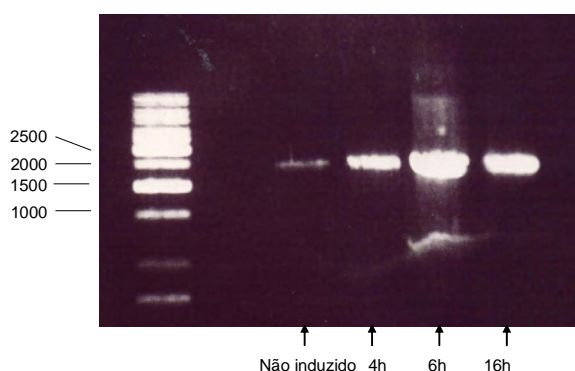


Figura 19. Aumento da expressão de RNAm que codifica para Heparitinase I, em função do tempo de indução.

RNA total foi extraído, transcrito reversamente em cDNA e amplificado por PCR com primers específicos para Htsel (94°C, 1min; 55°C, 1 min; 68°C, 2 min; 40 ciclos). Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% contendo 0,01% de brometo de etídio. A figura mostra uma banda de 1980 pb referente à Htase I.

1.2. Purificação das liases induzidas de *Flavobacterium heparinum*: heparinase, heparitinases I e II, condroitinase AC

1.2.1. Cromatografia em DEAE-agarose

Para o primeiro passo de purificação do extrato bruto de *Flavobacterium heparinum* foi utilizada resina trocadora aniônica DEAE-agarose. O extrato bruto foi aplicado em coluna de 3.0 x 8.0 cm e eluído com tampão 1,2 EDA 0,1M e 0,5M em pH 7.0. As cromatografias foram realizadas a 4°C. A quantidade de proteína presente nas frações foram quantificadas a 280nm e alíquotas de cada fração foram incubadas com GAGs (18 horas, 30°C). Os produtos de degradação foram identificados e analisados em cromatografia descendente em papel e sistema SAX-HPLC. As frações contendo atividade enzimática foram concentradas sob atmosfera de nitrogênio para a segunda etapa de purificação.

1.2.2. Cromatografia em BioGel A-0.5 m

A cromatografia líquida em gel filtração foi realizada em sistema de baixa pressão (LPLC) e a 4°C, para manutenção da atividade enzimática. As enzimas foram aplicadas em resina Bio-Gel A-0.5 m de 200-400 mesh (coluna de 4.0 x 120.0 cm) e eluídas com tampão EDA 0,1M, pH 7.0 por pressão hidrostática e fluxo de 16 mL/h. A quantidade de proteína presente nas frações foram

quantificadas a 280nm e alíquotas de cada fração foram incubadas com GAGs (18 horas, 30°C). Os produtos de degradação foram identificados e analisados em cromatografia em papel e sistema SAX-HPLC.

2. Clonagem e purificação da heparitinase I e heparinase recombinantes de *Flavobacterium heparinum*

Flavobacterium heparinum foi transferida para 10 mL de meio líquido estéril contendo tripticase 2,7% e glicose 0,25% e cultivada por 18 horas, a 30°C com agitação (100 r.p.m.). As bactérias foram, então, coletadas por centrifugação a 10.000 X g, 4°C, ressuspensas em 1mL de EDA 0,1M, pH 7.0 e sonicadas (4 °C , 80mHZ, 5 cycles of 30 seg em intervalos de 1 minuto). Alíquota de 1µL do lisado foi usado como molde para reação de PCR (*polimerase chain reaction*), utilizando *primers* específicos para heparitinase I (Godavarti et al. 1996) e heparinase (Sasisekharan et al., 1993), já clonadas e descritas na literatura.

2.1. Obtenção do fragmento de DNA

2.1.1. Heparitinase I

Para heparitinase I, os *primers* foram desenhados de modo que o DNA a ser amplificado contivesse, em sua extremidade 5' um sítio de restrição para enzima *Nco I*, e na extremidade 3', para a enzima *Xho I*.

“*Primer sense*”: 5'CATGCCATGGACCAGGAAAGATTTTGACC3'

“*Primer antisense*”: 5'CCCTCGAGGCTAAGGAACCAACACAAG 5'

A reação foi realizada em termociclador, que executou programação de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos seguidos de desnaturação (94°C por 1min), hibridização dos oligonucleotídeos (55°C por 1 min), e extensão (68°C por 2 min) e extensão final a 72°C por 7 min.

Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) (Tris Base 0,04 M, EDTA 0,001 M e ácido acético 0,12%) contendo 0,01% de brometo de etídio. Após 40 minutos de migração eletroforética a 100 V, a banda correspondente ao tamanho da

sequência de DNA que codifica para heparitinase I foi recortada do gel, o DNA foi extraído do gel de agarose (Promega) segundo protocolo do fabricante e eluído em 30 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.

2.1.2. Heparinase

Para heparinase, os *primers* foram desenhados de modo que o DNA a ser amplificado contivesse, em sua extremidade 5', um sítio de restrição para enzima *Xho I*, e na extremidade 3', para a enzima *BamH I*.

“*Primer sense*”: 5'GGGCTCGAGCAGCAAAAAAATCCGG3'

“*Primer antisense*”: 5'GGATCCCTATCTGGCAGTTTCGCTG3'

A reação foi realizada em termociclador que executou programação de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos seguidos de desnaturação (94°C por 1min), hibridização dos oligonucleotídeos (50°C por 1 min), e extensão (72°C por 2 min) e uma extensão final a 72°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% em tampão TAE contendo 0,01% de brometo de etídio como já descrito para heparitinase I.

2.2. Clonagem do fragmento de DNA da Heparitinase I e Heparinase em vetor de seqüenciamento pGEM-T

Para as duas liases, o produto de PCR purificado do gel de agarose foi ligado ao vetor pGEM-T usando T4 DNA ligase em 60 mM de Tris-HCl, pH 7.8, MgCl₂ 20mM, DDT 20mM, ATP 1mM e PEG 10% por uma hora à temperatura ambiente.

Bactérias cálcio-competentes foram utilizadas para armazenar os plasmídeos recombinantes para ambas as enzimas. Cepas de DH5α armazenadas a -70°C foram previamente descongeladas em gelo por 15 min e preparadas de acordo com o método de Inoue (Inoue et al., 1990). Alíquota de 5 µL da reação de ligação foi adicionada a 100 µL de DH5α-competente.

A mistura contendo as bactérias competentes e a reação de ligação foi incubada por 30 min em banho de gelo (4°C). A seguir, a mistura foi submetida

à choque térmico a 42°C por 1 minuto e meio, passando novamente para o banho de gelo por 2 min.

Após a transformação, 900 µL de meio específico, denominado SOC (bactotripton 2%, extrato de fungo 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, magnésio 20mM e glicose 20mM), foram adicionados à reação, seguindo de incubação a 37°C sob agitação (250 r.p.m) por 1h. Essa solução foi semeada em placa contendo meio de cultura LB-Ágar (*Luria Broth* – Tripton 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,5). Além disso, as placas continham 100 µg/mL de ampicilina (antibiótico marcador de resistência do plasmídeo pGEM-T).

Diferentes colônias foram analisadas a fim de se detectar clones positivos. Cada colônia foi incubada em 3 mL de meio LB contendo ampicilina 100 µg/ mL, por 8h e sob agitação de 300 r.p.m. a 37°C. Após o crescimento, o meio foi centrifugado (13.000 x g, 5 min), os plasmídeos foram extraídos utilizando-se o *kit* Qiagen Miniprep (QIAGEN), segundo protocolo do fabricante e submetidos a reação de PCR com *primers* T7 e SP6, os quais anelam-se ao vetor, flanqueando a região de clonagem. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE, contendo brometo de etídio. Os clones positivos foram submetidos a PCR para sequenciamento: desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos (94°C, 20 seg; 42°C, 20 seg; 60°C, 20 seg). Na reação foram utilizados 2µL do plasmídeo recombinante, 8 µL do tampão Tris-HCl 160mM, MgCl₂ 4mM, pH 9,0, 5µL de água, 1 µL de *primer*, além de 4µL do reagente "*Dyynamic*", que contém Taq DNA polimerase, os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e os quatro dideoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), sendo que cada ddNTP encontra-se marcado com um fluoróforo diferente. Assim, o sequenciamento de DNA em ambas as direções foi realizado pela incorporação do dideoxinucleotídeo no terminal das cadeias como descrito pelo fabricante. O dados de sequenciamento foram analisados usando FinchTv editor (Geospiza, Inc) e programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) of *Bioinformatics Center Institute for Chemical Research* (NCBI, USA).

2.3. Clonagem em vetor de expressão

2.3.1. Heparitinase I

O vetor pET-26b foi escolhido para expressão da heparitinase I porque o gene é expresso com uma sequência líder da *Erwinia carotovora pelB* (pectase lyase B) na região N-terminal, que secreta a proteína no espaço periplasmático, além de uma sequência de histidina na região C-terminal (*His-Tag*) que facilita a purificação da proteína recombinante. Este vetor carrega o gene de resistência ao antibiótico kanamicina.

A sequência de DNA da heparitinase I e pET-26b (vetor:inserto - 1:10) foram ligados usando T4 DNA ligase (16°C por 18h), pela inserção de sítios de restrição para *Nco I* na extremidade 5', e *Xho I* na extremidade 3' de ambos os fragmentos.

Alíquota de 8µl da reação de ligação foi utilizada para a transformação de 100µl da bactéria competente de expressão *E. coli* BL21 (DE3). Para confirmar a ligação inserto-vetor, foi feita PCR das colônias utilizando-se desta vez os *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator*, os quais flanqueiam a região de clonagem do pET-26b.

2.3.2. Heparinase

Para aumentar a expressão foi escolhido o vetor pET-14b para clonagem de heparinase. Este vetor carrega uma sequência de histidina na região N-terminal (*His-Tag*), seguida de um sítio de clivagem de trombina, a fim de facilitar a purificação da proteína recombinante. O vetor pET-14b carrega gene de resistência a ampicilina.

A sequência de DNA da heparinase e o vetor pET-14b (vetor:inserto - 1:10) foram ligados usando T4 DNA ligase (16°C por 18h), pela inserção de sítios de restrição para *Xho I* na extremidade 5' e *BamH I* na extremidade 3' de ambos os fragmentos.

Alíquota de 8µl da reação de ligação foi utilizada para a transformação de 100µl da bactéria competente de expressão *E. coli* Rosetta-gami (DE3), a

qual carrega três plasmídeos que codificam chaperonas, capazes de facilitar a formação de pontes dissulfeto das enzimas expressas no citoplasma, ajudando na manutenção da conformação e atividade catalítica. Por possuir três plasmídeos, esta bactéria já carrega, portanto, resistência a três antibióticos: kanamicina (kan), cloranfenicol (cam) e tetraciclina (tet). A inserção do plasmídeo recombinante para heparinase em *E. coli* Rosetta-gami (DE3) torna a bactéria resistente a mais um antibiótico, ampicilina. Para confirmar a ligação inserto-vetor, foi feita PCR das colônias utilizando-se os *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator*, os quais flanqueiam a região de clonagem do pET-14b.

2.4. Expressão das enzimas recombinantes

2.4.1. Heparitinase I

Clones positivos para heparitinase I recombinante foram inoculados em 50mL de meio LB líquido contendo 30µg/ mL de kanamicina (resistência do pET-26b). As bactérias foram mantidas sob agitação a 250 r.p.m., 37°C, por 16 horas. Após crescimento, 10 mL do caldo foram repicados em 1 L de meio LB contendo o mesmo antibiótico e submetidos a novo crescimento (37°C, 250 r.p.m). Ao atingir OD₆₀₀ 0.5, o caldo bacteriano foi induzido com 1mM de IPTG por 16 h, 30°C, 250 r.p.m. Após indução, as células foram centrifugadas (4000 r.p.m. a 4°C, por 15min) e ressuspensas em 100mL de tampão Tris-HCl pH 8.0, 20% de sacarose para rompimento da membrana externa das bactérias por choque osmótico e liberação do material armazenado no espaço periplasmático.

2.4.2. Heparinase

Colônias de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante para heparinase foram inoculadas em 50mL de meio LB líquido contendo 4 antibióticos: 100 µg/ ml de ampicilina (resistência do pET-14b), 30 µg/ mL de kanamicina, 34 µg/ mL de cloranfenicol e 12,5 µg/ mL de tetraciclina. As bactérias foram mantidas sob agitação a 250 r.p.m., 37°C, por 16 horas. Após crescimento, 10 mL do caldo foram repicados em 1 L de meio LB

contendo os mesmos antibióticos e submetidos a novo crescimento (37°C, 250 r.p.m). Ao atingir OD₆₀₀ 0.5, o caldo bacteriano foi induzido com 1mM de IPTG por 16 h, 30°C, 250 r.p.m. Após indução, as células foram centrifugadas (4000 r.p.m. a 4°C, por 15min), ressuspensas em 30mL de HEPES 50mM, pH 7.0, sonificadas de forma intermitente (4°C, 80mHZ, 5 ciclos de 30 seg com intervalos de 30 seg) e o extrato lisado foi ultracentrifugado (100,000 x g a 4°C por 1 hora).

2.5. Mutagênese sítio dirigida

Mutações pontuais sítio dirigidas da histidina 165 e glutamina 163 foram feitas em heparinase recombinante para avaliação do envolvimento desses resíduos na atividade catalítica da enzima, com base no descrito para heparinase de *B. thetaiotaomicron* (Han et al., 2009).

Os mutantes foram produzidos seguindo o protocolo descrito junto ao kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis*, utilizando aproximadamente 50ng de cDNA molde e 125 ng de cada oligonucleotídeo *sense* ou *anti-sense* para as respectivas mutações. Os oligonucleotídeos foram construídos de modo a se obter as mutações dos aminoácidos desejados, sendo que para cada mutação foram feitos oligos complementares *sense* (5'- 3') e *anti-sense* (3'- 5'), ambos contendo o novo códon para o aminoácido desejado.

As amplificações dos plasmídeos circulares contendo o inserto para heparinase foram feitas por reações de PCR (1 ciclo a 95° C por 30 segundos, 16 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 95° C por 30 segundos, 55° C por 1 minuto e 68° C por 15 minutos, e 1 ciclo extra de 10 min a 68° C).

Os produtos destas reações de PCR foram então analisados individualmente por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE (40mM Tris-acetato e 1 mM EDTA pH 8,0), aplicando-se uma corrente de 100 V/cm². Confirmada a amplificação do cDNA correspondente, o mesmo foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico. As células foram semeadas em placas contendo meio LB-Agar com ampicilina (100 µg/ml), e incubadas durante 18 horas, a 37° C. Dessas placas, colônias individuais expressando o gene de resistência à ampicilina foram

colhidas aleatoriamente, e seu DNA plasmidial isolado por “mini-preps” (QIAGEN) conforme descrito pelo fabricante. A identificação de seqüências de DNA contendo a mutação desejada foi realizada por seqüenciamento automático do DNA correspondente.

A eficiência catalítica das enzimas selvagem e mutantes, bem como o efeito do pH sobre a atividade das enzimas mutadas foram medidas diretamente pela mudança de absorbância a 232 nm por unidade de tempo ($E_M = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) na presença de 1085 μM de heparina e 10mM Ca^{2+} . Para análise da eficiência catalítica, a reação foi realizada em tampão HEPES 50 mM, pH 7.0, a 30°C; para análise do efeito do pH foi utilizado tampão universal de pH: 25 mM ácido acético, 25 mM MES, 25 mM glicina, 75 mM Tris base, com pH variando de 4.50 - 9.50.

2.6. Purificação das enzimas recombinantes

2.6.1. Resina Ni^{2+} -agarose

O extrato bruto foi incubado com resina Ni^{2+} -agarose (5-10 mg de proteína/ mL de resina Ni-NTA) por 16 horas a 4°C, sob agitação. Resina e extrato bruto foram, então, empacotados em coluna e a enzima recombinante de interesse foi eluída em tampão HEPES 50 mM, pH 7.0 contendo imidazol 300mM. As frações contendo atividade enzimática foram dessalinizadas por centrifugação (Vivaspin 20 e Centricon YM10), concentradas e submetidas à cromatografia de troca aniônica em resina Q-Sepharose.

2.6.2. Resina Q-Sepharose

As frações purificadas em Ni^{2+} -agarose foram concentradas (Vivaspin) e aplicadas em coluna de 3.0 x 8.0 cm contendo resina trocadora aniônica Q-Sepharose. As proteínas não retidas foram eluídas em tampão de aplicação HEPES 50 mM pH 7.0 e as retidas, no mesmo tampão contendo NaCl 1 M. As cromatografias foram realizadas a 4°C. As frações foram quantificadas a 280 nm e submetidas a ensaio enzimático pela incubação com GAGs (18 horas, 30°C).

3. Análise dos produtos de degradação gerados pela ação das liases

3.1. Ensaio de degradação enzimática

A atividade das enzimas foi testada incubando-se enzima com 100 µg de substrato (condroitim sulfato, heparam sulfato, heparina e água), a 30°C, por aproximadamente 18 horas.

3.2. Cromatografia em papel

A cromatografia em papel foi utilizada para separação analítica dos produtos formados por ação das enzimas específicas sobre GAGs. Os produtos formados pela incubação com as diferentes enzimas foram aplicados em papel Whatman nº1 e submetidos à cromatografia descendente por 18 horas, em dois tipos de solventes:

Solvente A: ácido isobutírico: NH₄OH 1,25 M (5:3 - v/v)

Solvente B: ácido isobutírico: NH₄OH 1,25 M (5:3,6 - v/v)

O solvente A é usado para separar dissacarídeos, enquanto o solvente B, para separar tetrassacarídeos.

A seguir, o cromatograma foi seco em estufa com aquecimento (80°C) e ventilação. Os produtos foram detectados por absorção em U.V. (230nm), revelados com nitrato de prata em meio alcalino e fixados com tiosulfato de sódio a 5% (Trevelyan, Procter & Harrison, 1950).

3.3. Cromatografia em Sistema SAX-HPLC

O sistema SAX-HPLC foi usado para separar e caracterizar os produtos de degradação da heparina pela ação da heparinase. Os produtos de degradação foram aplicados em coluna Zorbax SAX 4.6 x 150 mm, partícula de 5 µm, em cromatógrafo Akta Purifier, com gradiente de 0 - 1,5 M NaCl e fluxo de 1mL/ min, durante 30min. Os produtos foram detectados por absorção de radiação U.V. a 232 nm.

4. Caracterização de glicosaminoglicanos e enzimas

4.1. Eletroforese em gel de agarose

Este método permite a identificação de glicosaminoglicanos e foi usado para acompanhamento da degradação de GAGs por enzimas. Os produtos de degradação das enzimas foram aplicados a um gel de agarose 0,55% de 10,0 x 7,5cm com espessura de 0,2mm, em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05M pH 9,0 (5V/cm, 1h). Após a corrida, os compostos foram precipitados no gel com Cetavlon 0,1% (amina quaternária) por, no mínimo, 2h. O gel foi secado por ventilação; corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50% por 15min, e descorado em solução de ácido acético 1% e etanol 50%. Os glicosaminoglicanos foram quantificados por densitometria a 525nm em comparação com padrões conhecidos. Esse sistema foi desenvolvido por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich & Dietrich (1976) para caracterizar glicosaminoglicanos.

4.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As frações coletadas em cada fase de purificação da heparinase recombinante foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970, modificado).

Alíquotas de 20µL de cada amostra foram misturadas a tampão de amostra (glicerol 10%, 62,5 mM de Tris-HCl 1,25M, SDS 5%, pH 6,6, azul de bromofenol 0,1%, β-mercaptoetanol 5%), fervidas por 15 minutos a 100°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, preparado a partir de uma solução de acrilamida 30%, bsiacrilamida 0,8% e tampão *Lower Gel Buffer* (Tris 1,5M em HCl pH 8,8, SDS 0,4%). A corrida eletroforética foi realizada em presença de tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 15mM, SDS 0,1%) em um sistema vertical (Bio Rad), a 100V, 30mA. Os géis foram fixados (metanol 50%, ácido acético 12%) e submetidos à coloração com nitrato de prata 0,2% ou Coomassie Blue R250 0,2% em metanol 50% e ácido acético 10%.

4.3. Zimografia

Para a avaliação da atividade da heparitinase I de *F. heparinum* e a estimativa de seu peso molecular, foi empregada a técnica de SDS-PAGE descrita acima. O gel foi preparado em presença de heparam sulfato de pâncreas bovino (340 µg/mL) conforme descrito por Miura et al. (1995) com pequenas modificações. As amostras de enzima foram tratadas com tampão de amostra não-redutor (glicerol 10%, 62,5 mM de Tris-HCl 1,25M, SDS 5%, pH 6,6, azul de bromofenol 0,1%), e aplicadas ao gel, sendo a corrida realizada a 15 mA e a 4°C. Após a eletroforese, o SDS presente no gel foi removido por duas lavagens consecutivas de 30min, numa solução de triton X-100 2,5%. O gel foi então incubado numa solução-tampão EDA 0,1M, pH 7,0 por 16h a 30°C. As proteínas residuais do gel foram removidas pela incubação do mesmo numa solução de proteinase K (0,1mg/ml) por 2h a 37°C. O gel foi lavado por 20 min em solução descorante (etanol 30% e ácido acético 10%), corado com Alcian Blue 8GX (0,5% dissolvido em solução descorante) por 1h e descorado para visualização. As bandas claras do gel contra o fundo azul corado indicam as regiões com atividade enzimática.

4.4. Immunoblotting

No caso de procedimento de *immunoblotting*, após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi submetido à transferência dos compostos presentes no gel em membrana de nitrocelulose. Terminada a transferência, a membrana foi incubada em solução de caseína 5%, diluído em PBS (*phosphate buffered saline* – 0,13M NaCl, 0,007M Na₂HPO₄, 0,003M NaH₂PO₄), para bloqueio de ligações de proteínas inespecíficas, por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos e incubada com anticorpo primário anti-His (GE) diluído 1:3000 em PBS contendo 1% de BSA (*bovine serum albumin*), por 2 horas, à temperatura ambiente ou 18 horas à 4°C. A membrana foi lavada com PBS (3 vezes por 5 minutos) e incubada com anticorpo secundário anti-mouse, diluído 1:5000 em PBS contendo 1% de BSA, por 2 horas na ausência de luz. A membrana foi, então, lavada com PBS (3 vezes por 5 minutos) e revelada por quimioluminescência.

5. Cinética Enzimática

As reações enzimáticas foram realizadas em espectrofotômetro U.V. equipado com célula termoestática. Para o cálculo da molaridade de heparina foi utilizado a massa molecular média equivalente a 12 kDa. As reações foram feitas em cubetas de quartzo contendo heparinase nativa ou recombinante; heparina (2 - 100 μM) em ensaios com heparinase nativa e heparina (21,7 – 2171 μM) para ensaios com heparinase recombinante; e CaCl_2 (0.05-10mM) em tampões Tris-acetato, acetato de sódio, ou HEPES, com volume final de 1000 μL . A atividade catalítica sobre heparina foi medida diretamente pela mudança de absorbância a 232 nm por unidade de tempo ($E_M = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). As velocidades iniciais ($\Delta A_{232}/\text{min}$) foram calculadas usando somente 5% ou menos da concentração de heparina (mol de ácido urônico). Os parâmetros cinéticos da heparinase (K_S , $V_{\text{máx}}$ e pK) foram determinados usando um software GraFit V.5.0, Erithacus Software Ltd. As reações enzimáticas com heparitinase I foram realizadas da mesma maneira, porém, o substrato utilizado foi heparam sulfato em concentrações de 21,7 – 2171 μM e sem a presença de CaCl_2 .

5.1. Efeitos do Ca^{2+} sobre atividade da heparinase

Atividade da heparinase foi determinada na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-2 mM), 10 μM de heparina em 50 mM de Tris-acetato, pH 7,0, a 26°C. EDTA foi adicionado a várias concentrações (0-1,2 mM) para análise de seu efeito sobre heparinase pré-incubada com 10 μM de heparina e 2 mM de CaCl_2 , a 25°C. Os dados da ativação pelo Ca^{2+} foram analisados por regressão não-linear baseadas na equação:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [SA]}{K_{SA} \left(1 + \frac{[S]}{K_S} \right) + [SA]}$$

5.2. Efeito da temperatura e pH sobre atividade da heparinase

Os efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade de heparinase foram medidos em tampão Tris-acetato, acetato de sódio ou HEPES, $\mu = 0.05$ M, pH variando de 4.50 - 9.50 na presença de CaCl_2 10 mM. O cálculo da energia de ativação (E_a) da reação foi definido pela equação de Arrhenius:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right)$$

onde k_1 e k_2 são constantes de dissociação de reações específicas em T_1 e T_2 , R é a constante dos gases.

O efeito da mudança de temperatura sobre pK_a é dado pela relação integrada de Van't Hoff:

$$pK_a = \frac{\Delta H_{ion}}{2.3R} \frac{1}{T} - \frac{\Delta S_{ion}}{2.3R}$$

Os valores de pK_a dos grupos prototrópicos do sítio ativo da heparinase foram determinados medindo-se os valores de k_{cat}/K_S , k_{cat} e K_S dependentes de pH. Os dados foram analisados de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\lim 10^{(pH - pK_1)}}{10^{(2pH - pK_1 - pK_2)} + 10^{(pH - pK_1)} + 1}$$

Os dados da influência do pH sobre $1/K_{SA}$ foram analisados baseados na equação abaixo:

$$\frac{\lim_1 + \lim_2 \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{10^{(pH-pK_a)} + 1}$$

5.3. Efeito de solventes orgânicos sobre valores de pKa da heparinase

A influência de solventes orgânicos sobre os valores de pKa dos grupos prototrópicos de heparinase foi estudada, na presença de etanol (20% v/v), acetonitrila (20% v/v) ou dioxano (7.5% v/v) em tampão Tris-acetato ou acetato de sódio na presença de 10 mM CaCl₂. Além disso, a atividade da enzima foi testada em diferentes concentrações desses solventes orgânicos em tampão Tris-acetato 50 mM ou acetato de sódio 50 mM.

5.4. Efeito da relação D₂O/H₂O na atividade da Heparinase

Com o objetivo de verificar a quantidade de prótons envolvidos no mecanismo catalítico da heparinase, a reação enzimática foi realizada em diferentes proporções de água deuterada (Northrop, 1981).

Atividade da heparinase recombinante sobre heparina foi determinada na presença de 1085µM de heparina, 10mM Ca²⁺, em 50 mM de HEPES, pH 7.0, preparado em meio com taxas crescentes de D₂O/H₂O, a 30°C. A velocidade máxima pôde ser calculada em diferentes proporções de mistura de solventes, a partir da Equação 5 (Enyedy & Kovach, 2004):

$$V_n = V_H (1 - n + n\varnothing_1)$$

Essa equação relaciona a dependência de V_{máx} da heparinase com a fração de água deuterada, n, numa mistura de solventes (H₂O/D₂O). Onde V_n e V_H são as V_{máx} em um sistema de solvente binário D₂O/ H₂O respectivamente e \varnothing_1 é o fator de proporcionalidade entre os solventes.

5.5. Efeito inibitório do condroitim sulfato supersulfatado sobre heparinase

Atividade da heparinase recombinante sobre heparina foi determinada em diferentes concentrações de condroitim sulfato supersulfatado (OSCS), contaminante da heparina comercial. Os testes cinéticos foram ensaiados na presença de 1085 μ M de heparina, 10mM Ca²⁺, em 50 mM de HEPES, pH 7,0, a 30°C.

6. Fluorescência intrínseca do triptofano da heparinase

A fluorescência intrínseca do triptofano foi monitorada pela emissão em 350 nm (fenda de 5 nm) após excitação no comprimento de onda de 285 nm. A varredura da fluorescência intrínseca da heparinase (30 ng/mL) isoladamente ou em associação conforme especificado em cada experimento foi realizada durante 60 seg. A seguir, foram feitas curvas da heparinase individualmente ou associadas na presença de diferentes concentrações de heparina ou OSCS (0.01 – 5 ug/mL). Foram também realizados experimentos empregando-se, simultaneamente, heparina e OSCS conforme indicado em cada experimento. As curvas hiperbólicas foram registradas e a variação de fluorescência (ΔF), utilizada para o cálculo das constantes de dissociação (K_D).

7. Modificações químicas da heparina

Heparina foi N-dessulfatada por solvólise 95% (Nagasawa & Inoue, 1980), liberando polissacarídeo não substituído, HepNH₃, após o que foi N-acetilado em presença de anidrido acético, produzindo um polímero completamente N-acetilado, HepNAc (Irimura, Nakajima & Nicolson, 1986).

Carboxi-redução da carboxila do ácido urônico para hidroxila (HepCarb-Red) foi realizada usando carbodiimida (EDC) solúvel em presença de borohidreto de sódio, como descrito por Taylor, Shively e Conrad (1976).

2-O-dessulfatação específica do ácido α -L-idurônico de heparina (HepIdoA,2-des) foi realizada em meio alcalino, a frio (Jaseja et al., 1989).

Epimerização de ácido α -L-idurônico de heparina para ácido α -L-galacturônico (HepGalA) foi realizado como proposto por Rej et al (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Purificação das enzimas induzidas de *Flavobacterium heparinum*: heparinase, heparitinase I e II, condroitinase AC

1.1. Cromatografia de troca iônica aniônica

A primeira etapa de purificação do extrato bruto descrita por Nader et al. (1990) envolve cromatografia de troca aniônica em DEAE Biogel (Figura 20), a qual retém as proteínas negativamente carregadas a pH 7.0, deixando passar as positivas, incluindo as liases, sulfatases e glicuronidases de *F. heparinum*. Essas enzimas apresentam carga positiva a pH 7.0, aumentando sua atração pela carga negativa dos GAGs.

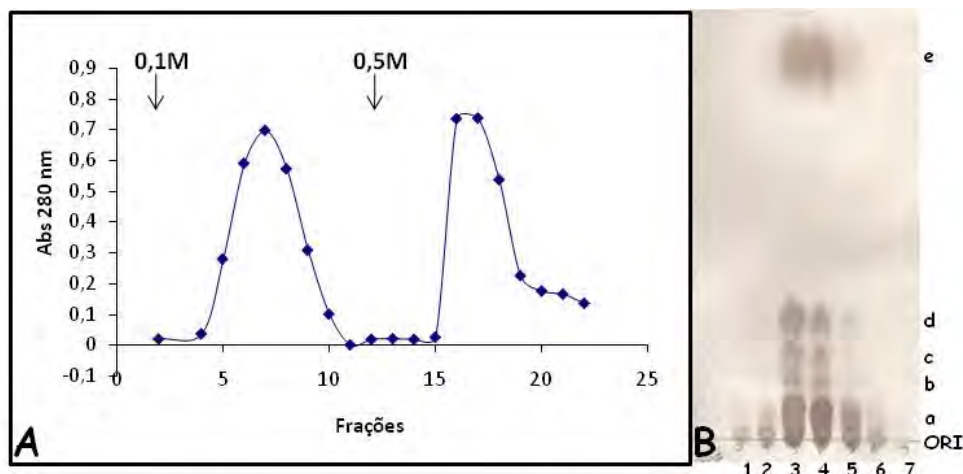


Figura 20. Fracionamento do extrato cru de *F. heparinum* por cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-BioGel.

Foi utilizada coluna de 50 mL de resina, com fluxo de 1 mL/ min, por pressão hidrostática. **A.** Perfil de eluição das proteínas a 280 nm. Frações (10 mL) foram eluídas com 0,1 e 0,5 M de tampão EDA pH 7.0. Aliquotas (10µL) foram incubadas com uma mistura de 100 µg de cada GAG (heparina, heparan sulfato e condroitim-6-sulfato) a 30°C, por 16 horas. **B.** Cromatografia descendente em papel dos produtos de degradação das frações coletadas da coluna. Os produtos de degradação foram aplicados em papel Whatman n°1, e submetidos à cromatografia descendente por 18 horas. As frações que apresentaram atividade enzimática foram identificadas por coloração com nitrato de prata em meio básico. A atividade enzimática foi detectada nas frações de 3 a 6. a. produtos insaturados de Hep e HS; b. GlcNS,6S; c. ΔU-GalNAc,6S; d. ΔUGalNAc,4S; e. HexNAc.

Fica clara a separação de dois grupos de proteínas, sendo que a atividade enzimática não ficou retida na coluna, sendo esta etapa importante na remoção de proteínas que interagem fortemente com as enzimas. Outro

aspecto importante a ressaltar é que o tampão EDA foi fundamental para alcançar esse nível de purificação. As interações são desfeitas em presença da amina protonada do tampão, o que não acontece em presença de tampões mais aniônicos.

1.2. Cromatografia em gel filtração

As frações 3-6 eluídas da resina DEAE-Biogel foram concentradas em sistema centricon 10.000 MWCO (Millipore) e aplicadas em resina Bio-Gel A-0.5m (120 x 4 cm) de 200 a 400 mesh equilibrada com tampão EDA 0,1 M, pH 7.0, à pressão hidrostática e fluxo de 16 mL/h. Frações de 10 mL foram coletadas, das quais alíquotas de 20 μ L foram incubadas com uma mistura de heparina, heparam sulfato e condroitim sulfato (100 μ g cada). Os produtos de degradação foram aplicados em Whatman n°1, submetidos à cromatografia descendente por 18 horas e corados com nitrato de prata em meio básico. Heparitinase II foi eluída nas frações 24 a 31; heparinase entre as frações 42 a 46; heparitinase I entre 55 e 59; e condroitinase AC entre 57 e 63 (Figura 21).

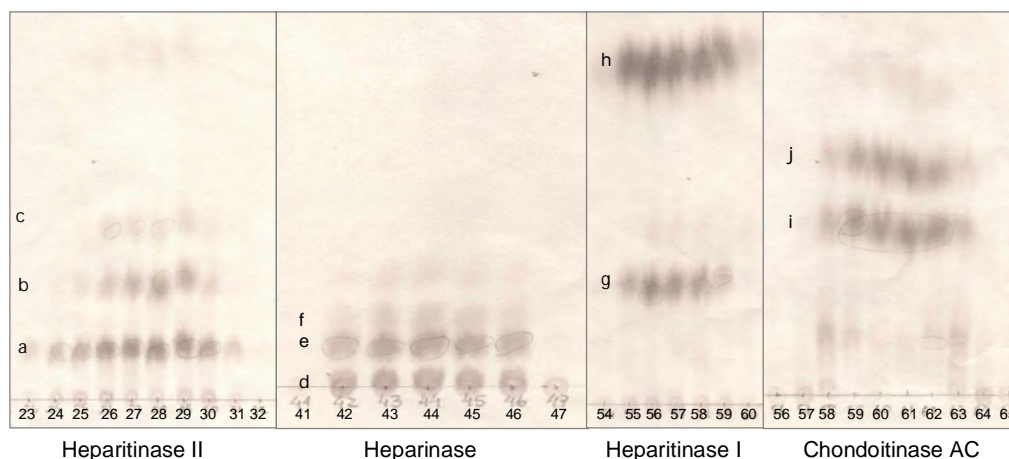


Figura 21. Fracionamento de liases de *F. heparinum* em cromatografia de gel filtração.

As frações 3-6 de DEAE-BioGel foram concentradas e aplicadas em resina Bio-Gel 0.5m. As atividades de diferentes liases foram analisadas pela formação de produtos específicos após incubação de todas as frações coletadas com heparina, heparam sulfato, e condroitim sulfato (100 μ g cada, 30°C, 18 horas). (a)- Δ U-GlcNS,6S, (b)- Δ U-GlcNS, (c)- Δ U-GlcNAc,6S, (d)- Δ -tetra, (e)- Δ U,2S-GlcNS,6S, (f)- GlcNS,6S, (g)- Δ U-GlcNS, (h)- Δ U-GlcNAc, (i)- Δ U-GalNAc,6S, (j)- Δ U-GalNAc,4S.

A resina BioGel A-0.5 m 200-400 mesh mostrou a melhor resolução para separação das amostras. Outras resinas e sistemas de cromatografia foram testados, incluindo sistemas de HPLC e FPLC, porém não apresentaram o perfil de eluição semelhante à coluna Bio-Gel e nem a conservação da atividade enzimática (Nader et al., 1990; Kobayashi, 1996).

2. Clonagem, expressão e purificação da heparitinase I recombinante

2.1. Seleção de clones

DNA de *F. heparinum* foi extraído e utilizado para clonagem da liase heparitinase I. Diferentes colônias foram selecionadas a fim de detectar clones positivos. As colônias foram submetidas à reação da PCR com *primers* que se anelam ao vetor, flanqueando a região de clonagem. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 22). Os clones positivos foram sequenciados para confirmação da clonagem.

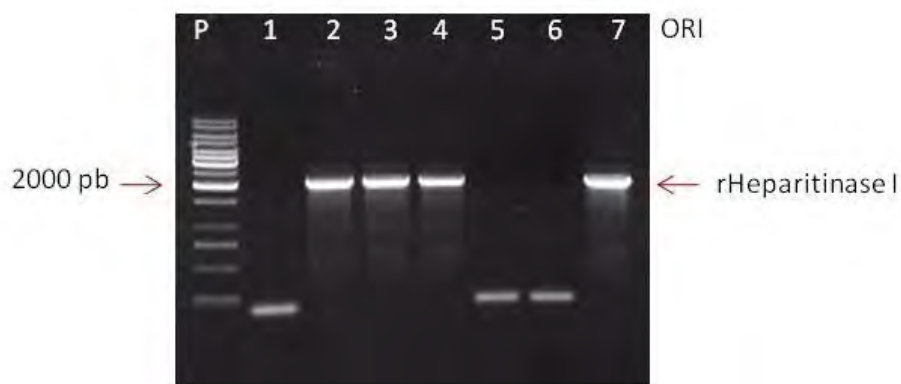


Figura 22. Produtos de PCR de diferentes colônias de *E. coli* transformada com plasmídeo recombinante para heparitinase I.

A reação de PCR foi realizada usando *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator*, que flaqueiam a região de clonagem do sistema pET. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,01% de brometo de etídio. Os clones positivos mostraram um produto de aproximadamente 2000 pares de bases, correspondente ao da heparitinase I clonada na literatura (1980 pb), sugerindo que o gene alvo estaria ligado ao vetor. P - padrão de tamanho molecular em pares de base; 1, 5, 6 - Clones negativos para o inserto de Htsel; 2, 3, 4, 7 - clones positivos para o inserto de Htsel.

2.2. Sequenciamento do produto da PCR

Os produtos da PCR foram sequenciados, confirmando assim a clonagem do segmento de DNA de *F. heparinum* que codifica a enzima heparitinase I (Figura 23).

1	ATGACTACGAAAATTTTAAAGGATCATTGTATTGCTGTAATTGCCCTATCGTCGGGAAATATACCTGCACAAAGCTC	80
1	ATGACTACGAAAATTTTAAAGGATCATTGTATTGCTGTAATTGCCCTATCGTCGGGAAATATACCTGCACAAAGCTC	80
81	TTCCATTACCAGGAAAGATTTTGACCACATCAACCTTGAGTATTCGGACTGGAAGGTTAATAAGCAGTTGCTGCC	159
81	TTCCATTACCAGGAAAGATTTTGACCACATCAACCTTGAGTATTCGGACTGGAAGGTTAATAAGCAGTTGCTGCC	159
160	GGCAACTATGACGATGCGGCCAAAGCATTACTGGCATACTACAGGAAAAAGTAAGGCCAGGGAACCTGATTTCAGT	237
160	GGCAACTATGACGATGCGGCCAAAGCATTACTGGCATACTACAGGAAAAAGTAAGGCCAGGGAACCTGATTTCAGT	237
238	AATGCAGAAAAGCTGCCGATATACGCCAGCCCATAGATAAGGTTACGCGTGAAATGGCCGACAAGCTTTGGTCCAC	315
238	AATGCAGAAAAGCTGCCGATATACGCCAGCCCATAGATAAGGTTACGCGTGAAATGGCCGACAAGCTTTGGTCCAC	315
316	CAGTTTCAACCGCACAAAGGCTACGGCTATTTTGATTATGGTAAAGACATCAACTGGCAGATGTGGCCGGTAAAGAC	393
316	CAGTTTCAACCGCACAAAGGCTACGGCTATTTTGATTATGGTAAAGACATCAACTGGCAGATGTGGCCGGTAAAGAC	393
394	AATGAAGTACGCTGGCAGTTGCACCGTGTAATGGTGGCAGGCTATGGCCCTGGTTTATCACGCTACGGGCGATGAA	471
394	AATGAAGTACGCTGGCAGTTGCACCGTGTAATGGTGGCAGGCTATGGCCCTGGTTTATCACGCTACGGGCGATGAA	471
472	AAATATGCAAGAGAATGGGTATATCAGTACAGCGATTGGGCCAGAAAAACCCATTGGGCCGTGTCGAGGATAATGAT	549
472	AAATATGCAAGAGAATGGGTATATCAGTACAGCGATTGGGCCAGAAAAACCCATTGGGCCGTGTCGAGGATAATGAT	549
550	AAATTTGTGTGGCGGCCCTTTGAAGTGTGCGACAGGGTACAAAGTCTTCCCCAACCTTCAGCTTATTTGAAACTCG	627
550	AAATTTGTGTGGCGGCCCTTTGAAGTGTGCGACAGGGTACAAAGTCTTCCCCAACCTTCAGCTTATTTGAAACTCG	627
628	CCAGCCTTTACCCAGCCTTTTAAATGGAATTTTAAACAGTTACCAACAGGCCGATTATTTATCTACGCATTAT	705
628	CCAGCCTTTACCCAGCCTTTTAAATGGAATTTTAAACAGTTACCAACAGGCCGATTATTTATCTACGCATTAT	705
706	GCCGAACAGGGAACACCGTTTATTGAAGCCCAACGCAACTTGTTGCAGGGGTATCTTTCCCTGAATTTAAAGAT	783
706	GCCGAACAGGGAACACCGTTTATTGAAGCCCAACGCAACTTGTTGCAGGGGTATCTTTCCCTGAATTTAAAGAT	783
784	TCACCAAGATGGAGGCAAACCGGCATATCGGTGCTGAACACCGAGATCAAAAAACAGGTTTATGCCGATGGGATGCAG	861
784	TCACCAAGATGGAGGCAAACCGGCATATCGGTGCTGAACACCGAGATCAAAAAACAGGTTTATGCCGATGGGATGCAG	861
862	TTTGAACCTTTCACCAATTTACCATGTAGCTGCCATCGATATCTTCTTAAAGGCCTATGGTTCTGCAAAACGAGTTAAC	939
862	TTTGAACCTTTCACCAATTTACCATGTAGCTGCCATCGATATCTTCTTAAAGGCCTATGGTTCTGCAAAACGAGTTAAC	939
940	CTTGAAAAAGAATTTCCGCAATCTTATGTACAACTGTAGAAAATATGATTATGGCGCTGATCAGTATTTCACTGCC	1016
940	CTTGAAAAAGAATTTCCGCAATCTTATGTACAACTGTAGAAAATATGATTATGGCGCTGATCAGTATTTCACTGCC	1016
1017	AGATTATAACACCCCTATGTTTGGAGATTCATGGATTACAGATAAAAAATTCAGGATGGCAGTTTGCCAGCTGG	1092
1017	AGATTATAACACCCCTATGTTTGGAGATTCATGGATTACAGATAAAAAATTCAGGATGGCAGTTTGCCAGCTGG	1092
1093	GCCCGGGTTTTCCCGCAAACAGGCCATAAAATATTTTGCTACAGATGGCAACAAGGTAAGGCGCCTAACTTTT	1168
1093	GCCCGGGTTTTCCCGCAAACAGGCCATAAAATATTTTGCTACAGATGGCAACAAGGTAAGGCGCCTAACTTTT	1168

1169	TATCCAAAGCATTGAGCAATGCAGGCTTTTATACGTTTAGAAGCGGATGGGATAAAAATGCAACCGTTATGGTATT	1244
1169	TATCCAAAGCATTGAGCAATGCAGGCTTTTATACGTTTAGAAGCGGATGGGATAAAAATGCAACCGTTATGGTATT	1244
1245	AAAAGCCAGTCCTCCCGGAGAATTTTCATGCCAGCCGGATAACGGGACTTTTGAACCTTTTATAAAGGCGAGAAAC	1320
1245	AAAAGCCAGTCCTCCCGGAGAATTTTCATGCCAGCCGGATAACGGGACTTTTGAACCTTTTATAAAGGCGAGAAAC	1320
1321	TTTACCCAGACGCCGGGTATTTGTGTATAGCGGCACGAAGCCATCATGAAACTGCGGAACTGGTACCGTCAAA	1396
1321	TTTACCCAGACGCCGGGTATTTGTGTATAGCGGCACGAAGCCATCATGAAACTGCGGAACTGGTACCGTCAAA	1396
1397	CCCGCATACAGCACGCTTACACTCGACAATCAAAATATGGTCATTACCAAGCCCGGCAAAACAAATGGGAAAC	1472
1397	CCCGCATACAGCACGCTTACACTCGACAATCAAAATATGGTCATTACCAAGCCCGGCAAAACAAATGGGAAAC	1472
1473	AGGAAATAACCTTGATGTGCTTACCTATACCAACCAAGCTATCCGAATCTGGACCATCAGCGCAGTGTACTTTTC	1548
1473	AGGAAATAACCTTGATGTGCTTACCTATACCAACCAAGCTATCCGAATCTGGACCATCAGCGCAGTGTACTTTTC	1548
1549	ATCAACAAAAAATACTTTCTGGTCATCGATAGGGCAATAGGCGAAGCTACCGGAAACCTGGGCGTACACTGGCAGC	1624
1549	ATCAACAAAAAATACTTTCTGGTCATCGATAGGGCAATAGGCGAAGCTACCGGAAACCTGGGCGTACACTGGCAGC	1624
1625	TTAAAGAAGACAGCAACCCTGTTTTCGATAAGACAAAGAACCGGTTTACACCACTTACAGAGATGGTAACAACCT	1700
1625	TTAAAGAAGACAGCAACCCTGTTTTCGATAAGACAAAGAACCGGTTTACACCACTTACAGAGATGGTAACAACCT	1700
1701	GATGATCCAATCGTTGAATGCGGACAGGACCAGCCTCAATGAAGAAGAAGGAAAGGTATCTTATGTTTACAATAAG	1776
1701	GATGATCCAATCGTTGAATGCGGACAGGACCAGCCTCAATGAAGAAGAAGGAAAGGTATCTTATGTTTACAATAAG	1776
1777	GAGCTGAAAAGACCTGCTTTCGTATTTGAAAAGCCTAAAAAGAATGCCGGCACACAAAATTTGTCAGTATAGTTT	1852
1777	GAGCTGAAAAGACCTGCTTTCGTATTTGAAAAGCCTAAAAAGAATGCCGGCACACAAAATTTGTCAGTATAGTTT	1852
1853	ATCCATACGACGGCCAGAAGGCTCCAGAGATCAGCATACGGGAAAACAAGGGCAATGATTTTGAGAAAGGCAAGCT	1928
1853	ATCCATACGACGGCCAGAAGGCTCCAGAGATCAGCATACGGGAAAACAAGGGCAATGATTTTGAGAAAGGCAAGCT	1928
1929	TAATCTAACCCCTTACCATTAAACGGAAAACAACAGCTTGTGTTGGTTCCTTAG	1980
1929	TAATCTAACCCCTTACCATTAAACGGAAAACAACAGCTTGTGTTGGTTCCTTAG	1980

Figura 23: Sequenciamento do fragmento de DNA que codifica para heparitinase I (vermelho) e alinhamento com sequência de DNA da heparitinase I clonada na literatura (Godavarti et al., 1996) (azul).

Para o alinhamento, foram utilizadas as ferramentas *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) do *Bioinformatics Center Institute for Chemical Research* (NCBI, USA) e *CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment*, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2.

Os dados da Figura 23 mostram que a heparitinase I recombinante apresentou 100% de identidade com a enzima clonada na literatura (Godavarti et al., 1996). A sequência de nucleotídeos foi, então, traduzida utilizando a ferramenta *ExPASy* (<http://expasy.org/>) (Figura 24).

```

ATG ACT ACG AAA ATT TTT AAA AGG ATC ATT GTA TTT GCT GTA ATT GCC CTA TCG TCG GGA AAT
M T T K I F K R I I V F A V I A L S S G N

ATA CTT GCA CAA AGC TCT TCC ATT ACC AGG AAA GAT TTT GAC CAC ATC AAC CTT GAG TAT TCC
I L A Q S S S I T R K D F D H I N L E Y S

GGA CTG GAA AAG GTT AAT AAA GCA GTT GCT GCC GGC AAC TAT GAC GAT GCG GCC AAA GCA TTA
G L E K V N K A V A A G N Y D D A A K A L

CTG GCA TAC TAC AGG GAA AAA AGT AAG GCC AGG GAA CCT GAT TTC AGT AAT GCA GAA AAG CCT
L A Y Y R E K S K A R E P D F S N A E K P

GCC GAT ATA CGC CAG CCC ATA GAT AAG GTT ACG CGT GAA ATG GCC GAC AAG GCT TTG GTC CAC
A D I R Q P I D K V T R E M A D K A L V H

CAG TTT CAA CCG CAC AAA GGC TAC GGC TAT TTT GAT TAT GGT AAA GAC ATC AAC TGG CAG ATG
Q F Q P H K G Y G Y F D Y G K D I N W Q M

TGG CCG GTA AAA GAC AAT GAA GTA CGC TGG CAG TTG CAC CGT GTA AAA TGG TGG CAG GCT ATG
W P V K D N E V R W Q L H R V K W W Q A M

GCC CTG GTT TAT CAC GCT ACG GGC GAT GAA AAA TAT GCA AGA GAA TGG GTA TAT CAG TAC AGC
A L V Y H A T G D E K Y A R E W V Y Q Y S

GAT TGG GCC AGA AAA AAC CCA TTG GGC CTG TCG CAG GAT AAT GAT AAA TTT GTG TGG CGG CCC
D W A R K N P L G L S Q D N D K F V W R P

CTT GAA GTG TCG GAC AGG GTA CAA AGT CTT CCC CCA ACC TTC AGC TTA TTT GTA AAC TCG CCA
L E V S D R V Q S L P P T F S L F V N S P

GCC TTT ACC CCA GCC TTT TTA ATG GAA TTT TTA AAC AGT TAC CAC CAA CAG GCC GAT TAT TTA
A F T P A F L M E F L N S Y H Q Q A D Y L

TCT ACG CAT TAT GCC GAA CAG GGA AAC CAC CGT TTA TTT GAA GCC CAA CGC AAC TTG TTT GCA
S T H Y A E Q G N H R L F E A Q R N L F A

GGG GTA TCT TTC CCT GAA TTT AAA GAT TCA CCA AGA TGG AGG CAA ACC GGC ATA TCG GTG CTG
G V S F P E F K D S P R W R Q T G I S V L

AAC ACC GAG ATC AAA AAA CAG GTT TAT GCC GAT GGG ATG CAG TTT GAA CTT TCA CCA ATT TAC
N T E I K K Q V Y A D G M Q F E L S P I Y

CAT GTA GCT GCC ATC GAT ATC TTC TTA AAG GCC TAT GGT TCT GCA AAA CGA GTT AAC CTT GAA
H V A A I D I F L K A Y G S A K R V N L E

AAA GAA TTT CCG CAA TCT TAT GTA CAA ACT GTA GAA AAT ATG ATT ATG GCG CTG ATC AGT ATT
K E F P Q S Y V Q T V E N M I M A L I S I

TCA CTG CCA GAT TAT AAC ACC CCT ATG TTT GGA GAT TCA TGG ATT ACA GAT AAA AAT TTC AGG
S L P D Y N T P M F G D S W I T D K N F R

ATG GCA CAG TTT GCC AGC TGG GCC CGG GTT TTC CCG GCA AAC CAG GCC ATA AAA TAT TTT GCT
M A Q F A S W A R V F P A N Q A I K Y F A

ACA GAT GGC AAA CAA GGT AAG GCG CCT AAC TTT TTA TCC AAA GCA TTG AGC AAT GCA GGC TTT
T D G K Q G K A P N F L S K A L S N A G F

```

TAT	ACG	TTT	AGA	AGC	GGA	TGG	GAT	AAA	AAT	GCA	ACC	GTT	ATG	GTA	TTA	AAA	GCC	AGT	CCT	CCC
Y	T	F	R	S	G	W	D	K	N	A	T	V	M	V	L	K	A	S	P	P
GGA	GAA	TTT	CAT	GCC	CAG	CCG	GAT	AAC	GGG	ACT	TTT	GAA	CTT	TTT	ATA	AAG	GGC	AGA	AAC	TTT
G	E	F	H	A	Q	P	D	N	G	T	F	E	L	F	I	K	G	R	N	F
ACC	CCA	GAC	GCC	GGG	GTA	TTT	GTG	TAT	AGC	GGC	GAC	GAA	GCC	ATC	ATG	AAA	CTG	CGG	AAC	TGG
T	P	D	A	G	V	F	V	Y	S	G	D	E	A	I	M	K	L	R	N	W
TAC	CGT	CAA	ACC	CGC	ATA	CAC	AGC	ACG	CTT	ACA	CTC	GAC	AAT	CAA	AAT	ATG	GTC	ATT	ACC	AAA
Y	R	Q	T	R	I	H	S	T	L	T	L	D	N	Q	N	M	V	I	T	K
GCC	CGG	CAA	AAC	AAA	TGG	GAA	ACA	GGA	AAT	AAC	CTT	GAT	GTG	CTT	ACC	TAT	ACC	AAC	CCA	AGC
A	R	Q	N	K	W	E	T	G	N	N	L	D	V	L	T	Y	T	N	P	S
TAT	CCG	AAT	CTG	GAC	CAT	CAG	CGC	AGT	GTA	CTT	TTC	ATC	AAC	AAA	AAA	TAC	TTT	CTG	GTC	ATC
Y	P	N	L	D	H	Q	R	S	V	L	F	I	N	K	K	Y	F	L	V	I
GAT	AGG	GCA	ATA	GGC	GAA	GCT	ACC	GGA	AAC	CTG	GGC	GTA	CAC	TGG	CAG	CTT	AAA	GAA	GAC	AGC
D	R	A	I	G	E	A	T	G	N	L	G	V	H	W	Q	L	K	E	D	S
AAC	CCT	GTT	TTC	GAT	AAG	ACA	AAG	AAC	CGG	GTT	TAC	ACC	ACT	TAC	AGA	GAT	GGT	AAC	AAC	CTG
N	P	V	F	D	K	T	K	N	R	V	Y	T	T	Y	R	D	G	N	N	L
ATG	ATC	CAA	TCG	TTG	AAT	GCG	GAC	AGG	ACC	AGC	CTC	AAT	GAA	GAA	GAA	GGA	AAG	GTA	TCT	TAT
M	I	Q	S	L	N	A	D	R	T	S	L	N	E	E	E	G	K	V	S	Y
GTT	TAC	AAT	AAG	GAG	CTG	AAA	AGA	CCT	GCT	TTC	GTA	TTT	GAA	AAG	CCT	AAA	AAG	AAT	GCC	GGC
V	Y	N	K	E	L	K	R	P	A	F	V	F	E	K	P	K	K	N	A	G
ACA	CAA	AAT	TTT	GTC	AGT	ATA	GTT	TAT	CCA	TAC	GAC	GGC	CAG	AAG	GCT	CCA	GAG	ATC	AGC	ATA
T	Q	N	F	V	S	I	V	Y	P	Y	D	G	Q	K	A	P	E	I	S	I
CGG	GAA	AAC	AAG	GGC	AAT	GAT	TTT	GAG	AAA	GGC	AAG	CTT	AAT	CTA	ACC	CTT	ACC	ATT	AAC	GGA
R	E	N	K	G	N	D	F	E	K	G	K	L	N	L	T	L	T	I	N	G
AAA	CAA	CAG	CTT	GTG	TTG	GTT	CCT	TAG												
K	Q	Q	L	V	L	V	P	*												

Figura 24. Tradução da sequência de nucleotídeos do segmento de DNA que codifica para heparitinase I.

A tradução foi realizada utilizando o programa *EXPASY Proteomics Server* (*Expert Protein Analysis System*, <http://expasy.org>) do *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB, CH).

Confirmado que a enzima clonada e sequenciada correspondia à heparitinase I, procedeu-se, então, a sua expressão e purificação.

2.3. Expressão e purificação da heparitinase I recombinante

Após indução da expressão em *E. coli* BL21(DE3) por IPTG, as bactérias foram centrifugadas e submetidas a choque osmótico em tampão hipertônico para lise da membrana externa da bactéria e obtenção do extrato armazenado no espaço periplasmático (extrato periplasmático), como descrito em Métodos. O precipitado foi sonificado, sendo denominado extrato citoplasmático. O extrato periplasmático foi incubado com resina Ni^{2+} -agarose por 16 horas a 4°C, sob agitação. Decorrido o tempo, a resina foi empacotada e heparitinase I foi eluída com 300mM de imidazol (Figura 25A). As frações contendo atividade enzimática foram dessalinizadas por centrifugação (Vivaspin 20 e Centricon YM10) e concentradas para análises posteriores.

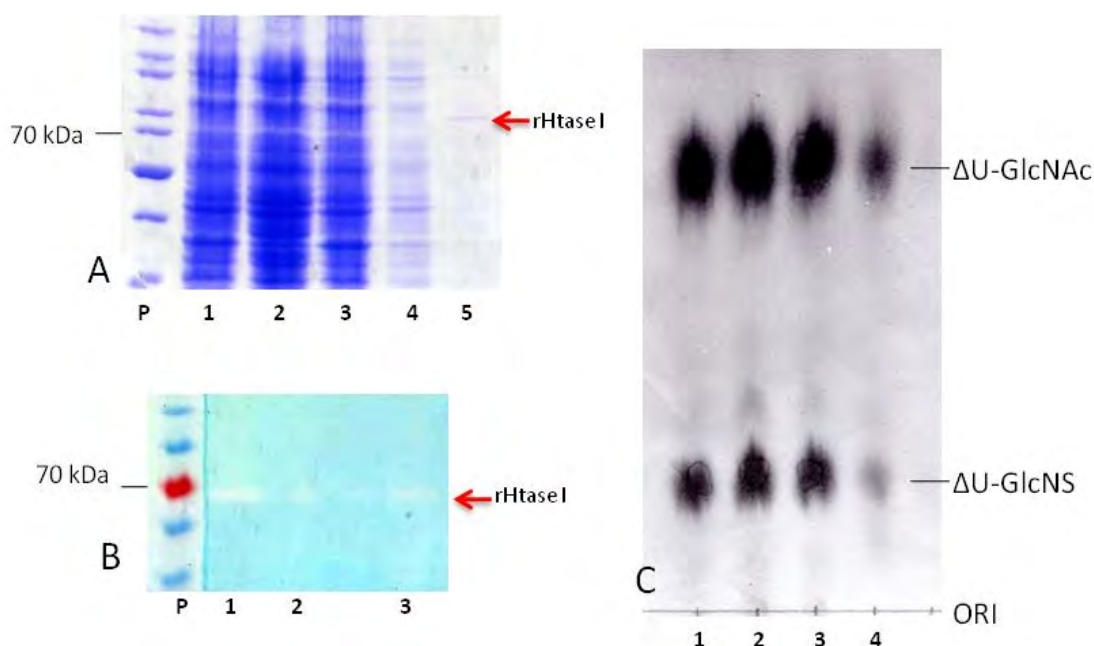


Figura 25. Expressão e purificação da heparitinase I recombinante.

A. SDS PAGE dos extratos protéicos de *E. coli* BL21(DE3) e da fração purificada em resina de afinidade a níquel. 1-3. Extrato citoplasmático ; 4. Extrato periplasmático não retido na resina de níquel; 5. Fração eluída da resina de níquel incubada com o extrato periplasmático. P, marcadores de massa molecular. **B.** Zimografia da HtaseI. HS foi impregnado ao gel e corado em azul; a banda clara representa a digestão do HS no local de migração da enzima. 1-2. Atividade da heparitinase I (HtaseI) nativa; 3. Atividade da rHtaseI. P, marcadores de massa molecular pré-corados. **C.** Cromatografia descendente em papel dos produtos de degradação do HS com HtaseI. 100 µg de HS foi incubado com 40 µL de HtaseI por 18 h, a 30°C. 1. HtaseI nativa; 2. Extrato citoplasmático; 3. Extrato periplasmático; 4. Fração do extrato periplasmático purificada em resina de afinidade por níquel.

3. Clonagem, expressão e purificação da heparinase recombinante

3.1. Seleção de clones

DNA de *F. heparinum* foi extraído e utilizado para clonagem da liase heparinase. A Figura 26 mostra os produtos da PCR das colônias selecionadas para detecção dos clones positivos para heparinase. As colônias foram submetidas a reação de PCR com *primers* que se anelam ao vetor, flanqueando a região de clonagem. Os clones positivos foram sequenciados para confirmação da clonagem.



Figura 26: Produtos de PCR de diferentes colônias de *E. coli* transformada com plasmídeo recombinante para heparinase.

A reação de PCR foi realizada usando *primers* *T7 promoter* e *T7 terminator*, que flaqueiam a região de clonagem do sistema pET. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,01% de brometo de etídio. Todos os clones selecionados para PCR foram positivos, produzindo um produto com aproximadamente 1.200 pares de bases, correspondente ao tamanho do segmento de DNA que codifica para heparinase (1118 pb). P – marcadores de tamanho molecular em pb; 1-6 – clones positivos para o inserto de heparinase.

3.2. Sequenciamento do produto da PCR

Os produtos de PCR foram sequenciados, confirmando assim a clonagem do segmento de DNA de *F. heparinum* que codifica a enzima heparinase.

O alinhamento apresentado na Figura 27 mostrou que heparinase recombinante apresentou 100% de identidade com a enzima clonada na literatura (Sasisekharan et al., 1993). A sequência de nucleotídeos foi, então, traduzida utilizando a ferramenta *Expasy* (Figura 28).

1	ATGAAAAAACAAATTCATATCTGATTGTACTTCAGCAACTGTTCTCTGTTTCGGCTTACGCCAGCAAAAAAATCCGGT	81
1	ATGAAAAAACAAATTCATATCTGATTGTACTTCAGCAACTGTTCTCTGTTTCGGCTTACGCCAGCAAAAAAATCCGGT	
82	AACATCCCTTACCGGGTAAATGTGCAGGCCGACAGTGCTAAGCAGAAGGCGATTATTGACAACAAATGGGTGGCAGTAG	160
82	AACATCCCTTACCGGGTAAATGTGCAGGCCGACAGTGCTAAGCAGAAGGCGATTATTGACAACAAATGGGTGGCAGTAG	160
161	GCATCAATAAACCTTATGCATTACAATATGACGATAAACTGCGCTTTAATGGAAAACCATCCTATCGCTTTGAGCTTA	238
161	GCATCAATAAACCTTATGCATTACAATATGACGATAAACTGCGCTTTAATGGAAAACCATCCTATCGCTTTGAGCTTA	238
239	AAGCGAAGACAATTCGCTTGAAGGTTATGCTGCAGGAGAAAACAAAGGGCCGTACAGAATTGTCGTACAGCTATGCAA	316
239	AAGCGAAGACAATTCGCTTGAAGGTTATGCTGCAGGAGAAAACAAAGGGCCGTACAGAATTGTCGTACAGCTATGCAA	316
317	CCACCAATGATTTTAAAGAAATTCCCCCAAGCGTATACCAAAATGCGCAAAAGCTAAAAACCGTTTATCATTACGGCA	394
317	CCACCAATGATTTTAAAGAAATTCCCCCAAGCGTATACCAAAATGCGCAAAAGCTAAAAACCGTTTATCATTACGGCA	394
395	AAGGGATTGTGAACAGGGGAGCTCCCGCAGCTATACCTTTTCAGTGTACATACCTCCTCCTTCCCCGACAATGCGA	472
395	AAGGGATTGTGAACAGGGGAGCTCCCGCAGCTATACCTTTTCAGTGTACATACCTCCTCCTTCCCCGACAATGCGA	472
473	CTACTATTTTGGCCAATGGCATGGTGCACCCAGCAGAACGCTTGTAGCTACACCAGAGGGAGAAATTAACACTGA	550
473	CTACTATTTTGGCCAATGGCATGGTGCACCCAGCAGAACGCTTGTAGCTACACCAGAGGGAGAAATTAACACTGA	550
551	GCATAGAAGAGTTTGGCCTTATACGACCGCATGATCTTCAAAAAAATATCGCCCATGATAAAGTTGAAAAAAG	628
551	GCATAGAAGAGTTTGGCCTTATACGACCGCATGATCTTCAAAAAAATATCGCCCATGATAAAGTTGAAAAAAG	628
629	ATAAGACGGAAAAATTACTTATGTAGCCGAAAGCCAAATGGCTGGAAGGTAGAACAAGGTGGTTATCCACGCTGG	706
629	ATAAGACGGAAAAATTACTTATGTAGCCGAAAGCCAAATGGCTGGAAGGTAGAACAAGGTGGTTATCCACGCTGG	706
707	CCTTTGGTTTCTTAAAGGGTATTTTACATCAAGGCAAACTCCGACCGCAGTGCGTTACCGACAAGCCGACCGTA	784
707	CCTTTGGTTTCTTAAAGGGTATTTTACATCAAGGCAAACTCCGACCGCAGTGCGTTACCGACAAGCCGACCGTA	784
785	ACAATGCCAATCCCGAGAATAGTGAAGTAATGAAGCCCTATTCTCGGAATACAAAACCTCAACCATTGCTTATAAAA	862
785	ACAATGCCAATCCCGAGAATAGTGAAGTAATGAAGCCCTATTCTCGGAATACAAAACCTCAACCATTGCTTATAAAA	862
863	TGCCCTTTGCCAGTTCCTTAAAGATTGCTGGATTACTTTTGATGTCGCCATAGACTGGACGAAATATGGAAAAGAGG	940
863	TGCCCTTTGCCAGTTCCTTAAAGATTGCTGGATTACTTTTGATGTCGCCATAGACTGGACGAAATATGGAAAAGAGG	940
941	CCAATACAATTTTGAACCCGGTAAGCTGGATGTGATGATGACTTATACCAAGAATAAGAAACCACAAAAGCGCAT	1017
941	CCAATACAATTTTGAACCCGGTAAGCTGGATGTGATGATGACTTATACCAAGAATAAGAAACCACAAAAGCGCAT	1017
1018	ATCGTAAACAGCAGGAAATCCTGATCGGACGTACGATGACGATGGCTATTACTTCAAATTGGAAATTACAGGG	1093
1018	ATCGTAAACAGCAGGAAATCCTGATCGGACGTACGATGACGATGGCTATTACTTCAAATTGGAAATTACAGGG	1093
1094	TCGGTAACAGCACGGTCCCGTTACTTATAACCTGAGCGGGTACAGCGAAACTGCCAGATAG	1155
1094	TCGGTAACAGCACGGTCCCGTTACTTATAACCTGAGCGGGTACAGCGAAACTGCCAGATAG	1155

Figura 27. Sequenciamento do fragmento de DNA recombinante que codifica para Heparinase (vermelho) e alinhamento com seqüência de DNA da heparinase clonada na literatura (Sasisekharan et al. 1993) (azul).

Foi utilizada a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) do *Bioinformatics Center Institute for Chemical Research* (NCBI, USA) e *CLUSTALW 2.1 multiple sequence alignment* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) do *European Bioinformatics Institute* (EBI, UK).

ATG	AAA	AAA	CAA	ATT	CTA	TAT	CTG	ATT	GTA	CTT	CAG	CAA	CTG	TTC	CTC	TGT	TCG	GCT
M	K	K	Q	I	L	Y	L	I	V	L	Q	Q	L	F	L	C	S	A
TAC	GCC	CAG	CAA	AAA	AAA	TCC	GGT	AAC	ATC	CCT	TAC	CGG	GTA	AAT	GTG	CAG	GCC	GAC
Y	A	Q	Q	K	K	S	G	N	I	P	Y	R	V	N	V	Q	A	D
AGT	GCT	AAG	CAG	AAG	GCG	ATT	ATT	GAC	AAC	AAA	TGG	GTG	GCA	GTA	GGC	ATC	AAT	AAA
S	A	K	Q	K	A	I	I	D	N	K	W	V	A	V	G	I	N	K
CCT	TAT	GCA	TTA	CAA	TAT	GAC	GAT	AAA	CTG	CGC	TTT	AAT	GGA	AAA	CCA	TCC	TAT	CGC
P	Y	A	L	Q	Y	D	D	K	L	R	F	N	G	K	P	S	Y	R
TTT	GAG	CTT	AAA	GCC	GAA	GAC	AAT	TCG	CTT	GAA	GGT	TAT	GCT	GCA	GGA	GAA	ACA	AAG
F	E	L	K	A	E	D	N	S	L	E	G	Y	A	A	G	E	T	K
GGC	CGT	ACA	GAA	TTG	TCG	TAC	AGC	TAT	GCA	ACC	ACC	AAT	GAT	TTT	AAG	AAA	TTT	CCC
G	R	T	E	L	S	Y	S	Y	A	T	T	N	D	F	K	K	F	P
CCA	AGC	GTA	TAC	CAA	AAT	GCG	CAA	AAG	CTA	AAA	ACC	GTT	TAT	CAT	TAC	GGC	AAA	GGG
P	S	V	Y	Q	N	A	Q	K	L	K	T	V	Y	H	Y	G	K	G
ATT	TGT	GAA	CAG	GGG	AGC	TCC	CGC	AGC	TAT	ACC	TTT	TCA	GTG	TAC	ATA	CCC	TCC	TCC
I	C	E	Q	G	S	S	R	S	Y	T	F	S	V	Y	I	P	S	S
TTC	CCC	GAC	AAT	GCG	ACT	ACT	ATT	TTT	GCC	CAA	TGG	CAT	GGT	GCA	CCC	AGC	AGA	ACG
F	P	D	N	A	T	T	I	F	A	Q	W	H	G	A	P	S	R	T
CTT	GTA	GCT	ACA	CCA	GAG	GGA	GAA	ATT	AAA	ACA	CTG	AGC	ATA	GAA	GAG	TTT	TTG	GCC
L	V	A	T	P	E	G	E	I	K	T	L	S	I	E	E	F	L	A
TTA	TAC	GAC	CGC	ATG	ATC	TTC	AAA	AAA	AAT	ATC	GCC	CAT	GAT	AAA	GTT	GAA	AAA	AAA
L	Y	D	R	M	I	F	K	K	N	I	A	H	D	K	V	E	K	K
GAT	AAG	GAC	GGA	AAA	ATT	ACT	TAT	GTA	GCC	GGA	AAG	CCA	AAT	GGC	TGG	AAG	GTA	GAA
D	K	D	G	K	I	T	Y	V	A	G	K	P	N	G	W	K	V	E
CAA	GGT	GGT	TAT	CCC	ACG	CTG	GCC	TTT	GGT	TTT	TCT	AAA	GGG	TAT	TTT	TAC	ATC	AAG
Q	G	G	Y	P	T	L	A	F	G	F	S	K	G	Y	F	Y	I	K
GCA	AAC	TCC	GAC	CGG	CAG	TGG	CTT	ACC	GAC	AAA	GCC	GAC	CGT	AAC	AAT	GCC	AAT	CCC
A	N	S	D	R	Q	W	L	T	D	K	A	D	R	N	N	A	N	P
GAG	AAT	AGT	GAA	GTA	ATG	AAG	CCC	TAT	TCC	TCG	GAA	TAC	AAA	ACT	TCA	ACC	ATT	GCC
E	N	S	E	V	M	K	P	Y	S	S	E	Y	K	T	S	T	I	A
TAT	AAA	ATG	CCC	TTT	GCC	CAG	TTC	CCT	AAA	GAT	TGC	TGG	ATT	ACT	TTT	GAT	GTC	GCC
Y	K	M	P	F	A	Q	F	P	K	D	C	W	I	T	F	D	V	A
ATA	GAC	TGG	ACG	AAA	TAT	GGA	AAA	GAG	GCC	AAT	ACA	ATT	TTG	AAA	CCC	GGT	AAG	CTG
I	D	W	T	K	Y	G	K	E	A	N	T	I	L	K	P	G	K	L
GAT	GTG	ATG	ATG	ACT	TAT	ACC	AAG	AAT	AAG	AAA	CCA	CAA	AAA	GCG	CAT	ATC	GTA	AAC
D	V	M	M	T	Y	T	K	N	K	K	P	Q	K	A	H	I	V	N
CAG	CAG	GAA	ATC	CTG	ATC	GGA	CGT	AAC	GAT	GAC	GAT	GGC	TAT	TAC	TTC	AAA	TTT	GGA
Q	Q	E	I	L	I	G	R	N	D	D	D	G	Y	Y	F	K	F	G
ATT	TAC	AGG	GTC	GGT	AAC	AGC	ACG	GTC	CCG	GTT	ACT	TAT	AAC	CTG	AGC	GGG	TAC	AGC
I	Y	R	V	G	N	S	T	V	P	V	T	Y	N	L	S	G	Y	S
GAA	ACT	GCC	AGA	TAG														
E	T	A	R	*														

Figura 28. Tradução da sequência de nucleotídeos do segmento de DNA que codifica para heparinase.

Tabela III. Dados do alinhamento da heparinase de diferentes bactérias.

Seq A	Nome	Comprimento	Seq B	Nome	Comprimento	Alinhamento
1	Hepase literatura	384	2	Hepase recombinante	384	100%
1	Hepase literatura	384	3	Hepase de <i>B. thetaiotaomicron</i>	376	64%
2	Hepase recombinante	384	3	Hepase de <i>B. thetaiotaomicron</i>	376	64%

A heparinase recombinante por nós descrita, que apresenta 100% de identidade com a clonada pelo grupo de Sasisekharan, apresentou 64% de identidade com aquela de *B. thetaiotaomicron*.

3.3. Expressão e purificação da heparinase recombinante

Colônias de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante para heparinase foram induzidas com 1 mM de IPTG a 30°C como descrito em Métodos. As bactérias foram coletadas e submetidas a lise por sonicação. O extrato bruto foi então separado dos restos celulares por ultracentrifugação (ver Métodos). A Figura 30 mostra uma expressão analítica, na qual colônias isoladas foram induzidas com IPTG e o extrato bacteriano, submetido a SDS-PAGE e comparado com o extrato de bactérias não induzidas. A atividade enzimática das frações induzidas foram analisadas por incubação com 100 µg de heparina e 10 mM de Ca²⁺ a 30°C, por 16 h. Os produtos de degradação foram aplicados em cromatografia descendente de papel.

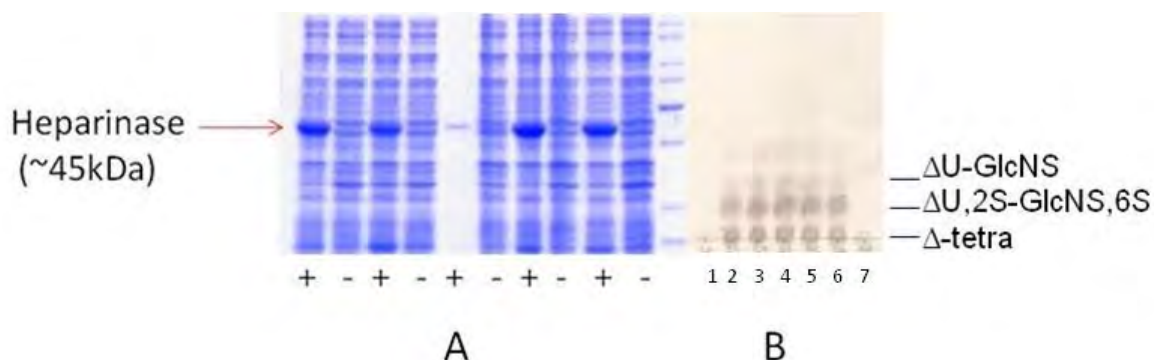


Figura 30. Ensaio de expressão da heparinase recombinante de *F. heparinum*.

A. SDS-PAGE do extrato bruto de *E. coli* transformada com plasmídeo recombinante para heparinase, induzida (+) e não induzida (-) por IPTG. **B.** Produtos de degradação da heparina visualizados após coloração com nitrato de prata em cromatografia em papel, após incubação do extrato bruto com 100 μ g de heparina e 10 mM de Ca^{2+} (30°C, 16h). 1- incubação de heparina com o extrato de *E. coli* não induzido por IPTG; 2 – incubação de heparina com heparinase nativa de *F. heparinum*; 3-6 – incubação de heparina com o extrato de *E. coli* induzido com IPTG; 7 – indução de heparina com água (branco).

A Figura 30 confirma a clonagem da enzima e o efeito indutor do IPTG sobre o promotor T7 do pET - 14b, iniciando a tradução da heparinase. O extrato induzido apresentou atividade sobre heparina, demonstrado pela detecção de seus produtos de degradação pela ação da heparinase: tetrassacarídeo insaturado, dissacarídeo insaturado trissulfatado e dissacarídeo insaturado dissulfatado.

O extrato bruto citoplasmático foi incubado com resina Ni^{2+} -agarose por 16 horas a 4°C, sob agitação. Decorrido o tempo, a resina foi empacotada e heparinase foi eluída com 300mM de imidazol (Figura 31A). As frações contendo atividade enzimática foram dessalinizadas por centrifugação (Vivaspin 20 e Centricon YM10), concentradas e aplicadas em resina de troca aniônica (Q-Sepharose) (Figura 32).

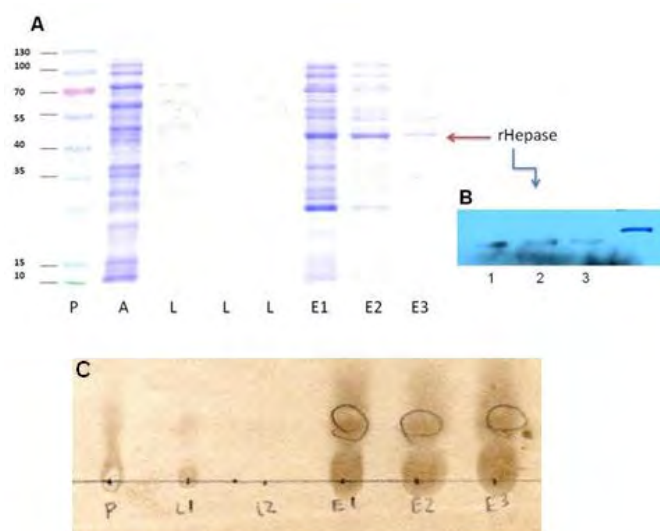


Figura 31. Purificação da heparinase recombinante.

A. SDS-PAGE das frações coletadas da cromatografia de afinidade em resina de níquel. P – Padrão de massa molecular; A – proteínas não ligadas à resina; L – lavagem da resina com tampão de aplicação (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7.0); E – eluição no mesmo tampão acrescido de 300 mM de imidazol. Cada fração E contém 10 mL de volume, sendo este o mesmo volume da coluna. **B.** A figura mostra a confirmação da presença da heparinase por *immunoblotting* utilizando anticorpo específico para região N-terminal rica em histidina (anti-His, Novagen). 1-3 – heparinase recombinante (rHepase). **C.** cromatografia em papel dos produtos de degradação da heparina incubada com as frações eluídas da resina níquel-agarose. P – proteínas não retidas na resina; L – lavagem; E1 – fração eluída 1; E2 – fração eluída 2; E3 – fração eluída 3.

As frações eluídas E1, E2 e E3 apresentaram atividade enzimática, mas as frações E2 e E3 apresentaram maior grau de pureza. Neste processo, foi obtido por volta de 10% de rendimento de proteína na fração E2 e E3 em relação ao extrato bruto de *E. coli*, porém, os dados mostraram que a heparinase eluída da cromatografia de afinidade em níquel-agarose ainda contém proteínas contaminantes. Assim, foram feitas tentativas de purificação envolvendo cromatografia de troca-iônica como mostrado na Figura 32. Fica claro que há separação da heparinase recombinante de proteínas contaminantes.

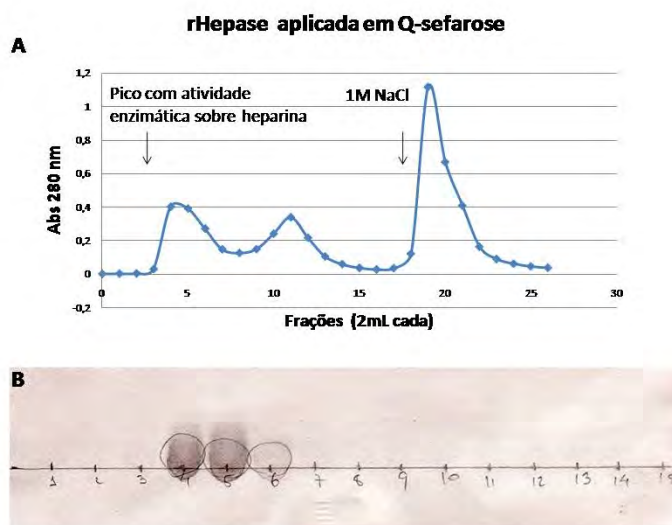


Figura 32: Fracionamento de rHepase em cromatografia de troca aniônica com resina Q-Sepharose.

As frações eluídas da resina Ni^{2+} -agarose foram dessalinizadas, concentradas e aplicadas em coluna Q-Sepharose equilibrada com tampão HEPES 50mM, NaCl 150mM, pH 7,0. As proteínas não retidas foram coletadas em frações de 2 mL e as proteínas retidas foram eluídas em frações de 2 mL no mesmo tampão em presença de NaCl 1M. Cada fração foi quantificada por absorbância a 280 nm e incubada com 100 μg de heparina e 10 mM de Ca^{2+} , a 30°C, por 16 h. Os produtos de degradação foram identificados por cromatografia descendente em papel pela absorção no UV seguida de coloração com nitrato de prata. A atividade enzimática da rHepase é observada no primeiro pico de leitura a 280 nm, nas frações não retidas.

Assim as frações 4, 5 e 6, eluídas da resina Q-sepharose, foram selecionadas e concentradas para dar continuidade aos testes cinéticos, por possuir maior grau de pureza, com atividade enzimática preservada. Para aumentar a precisão na caracterização dos produtos de degradação da heparina pela heparinase nos testes cinéticos que se seguem, foi realizada cromatografia em SAX-HPLC. Alíquota de 40 μL de enzima foi dessalinizada e incubada com 100 μg de heparina e 10 mM de Ca^{2+} a 30°C por 16 h. Decorrido o tempo, a incubação foi submetida à cromatografia em coluna Zorbax SAX 4.6 x 150 mm, partícula de 5 μm (Figura 33). A figura também mostra o perfil de eluição de padrões de dissacarídeos insaturados di- e trissulfatados, bem como de tetrassacarídeos penta- e hexassulfatados.

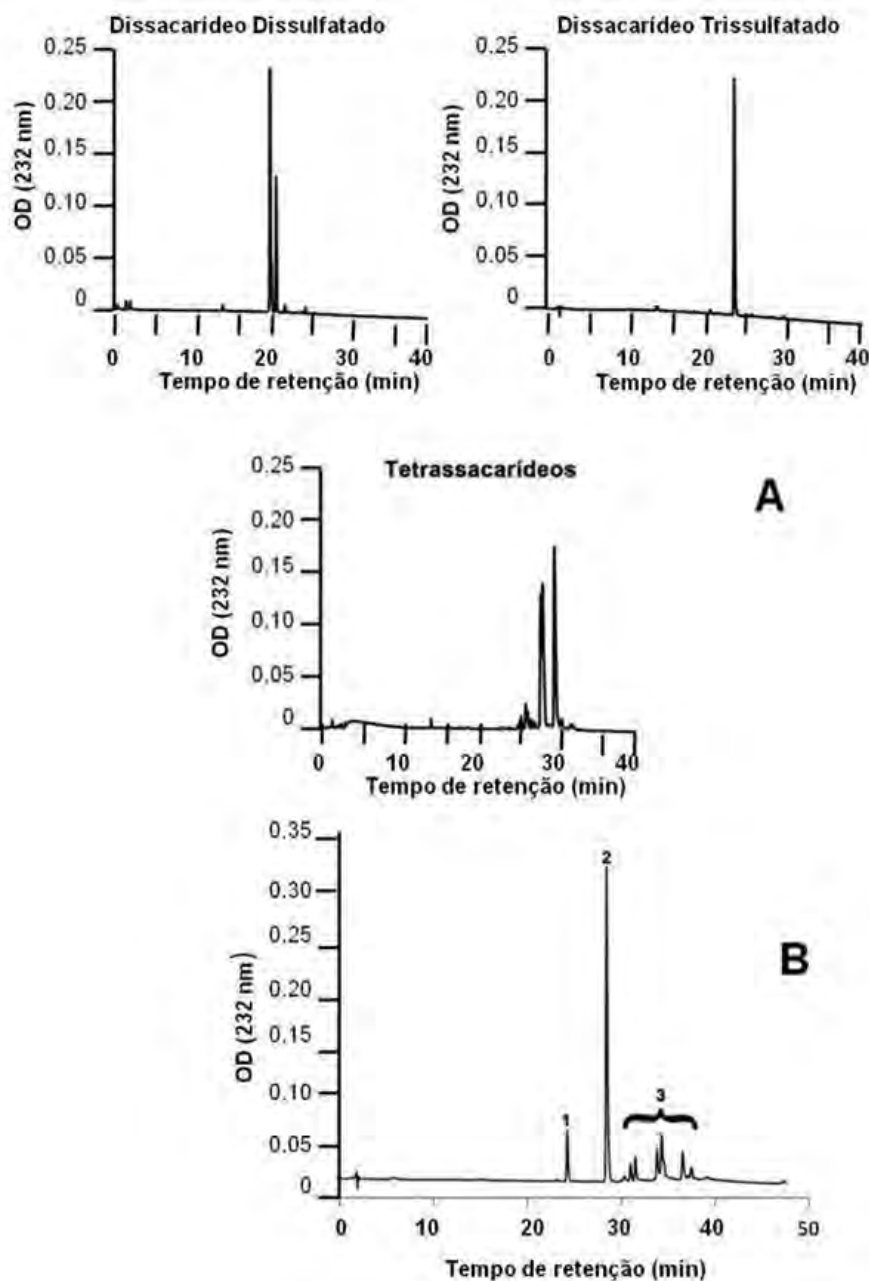


Figura 33: Cromatograma dos produtos de degradação da heparina pela ação da heparinase.

Uma alíquota da fração E2 foi incubada com heparina, como descrito em Método. Após a degradação, os produtos foram separados por cromatografia em coluna Zorbax SAX-HPLC e identificados pela comparação do tempo de retenção com um padrão de dissacarídeos e tetrassacarídeos insaturados, resultantes da degradação da heparina por heparinase, produzido em nosso laboratório (Nader et al., 1990). **A** – Padrão de sacarídeos aplicado em SAX-HPLC mostrando o tempo de retenção dos produtos de degradação da heparina por heparinase. **B** – produtos gerados na degradação de heparina pela fração E2. **1** - dissacarídeo insaturado dissulfatado (Δ U2SGlcNS/ Δ UGlcNS6S); **2** - dissacarídeo insaturado trissulfatado (Δ U2SGlcNS6S); e **3** - tetrassacarídeo insaturado (Δ U,2S-GlcNS,6S-GlcUA-GlcNS,6S).

A figura 33 também mostra que o produto gerado em maior quantidade é o dissacarídeo trissulfatado, como descrito desde 1969 por Dietrich (Dietrich, 1969 a, b; Perlin, Mackie, & Dietrich, 1971). Perlin, Mackie, & Dietrich (1971) mostraram que este composto representa 80% de todo produto liberado na degradação da heparina por heparinase, representando cerca de três quartos das moléculas de heparina intacta.

Uma vez obtida uma fração de heparinase recombinante razoavelmente limpa em relação ao extrato bruto inicial e apresentando atividade enzimática, esta amostra foi submetida aos testes cinéticos para estudo de seu comportamento catalítico.

4. Estudos cinéticos da heparitinase I

A clonagem da heparitinase I no sistema pET – 26b teve como objetivo facilitar a purificação e manter a atividade da enzima. Como o plasmídeo endereça a proteína para o espaço periplasmático, a purificação torna-se facilitada, pois a molécula está separada do citoplasma. Além disso, a conformação nativa da enzima é preservada, porque o endereçamento livra a molécula do englobamento em corpos de inclusão e processos reativos citoplasmáticos. Contudo, o rendimento na expressão e purificação da enzima é muito baixo, tornando o método inadequado para produção em larga escala.

Heparam sulfato de pâncreas bovino foi utilizado como substrato para o ensaio da atividade da Htsel. Os valores das concentrações de substrato foram expressos baseados nos teores de ácido urônico, já que HS, como todos os glicosaminoglicanos é um composto polidisperso. As concentrações variaram de 54 a 2224 μM , e foram calculadas em relação ao conteúdo de ácido urônico.

A atividade da Htsel foi monitorada em UV em função do tempo de reação, na presença de diferentes concentrações do substrato (Figura 34). Este experimento foi realizado com Htsel nativa e recombinante.

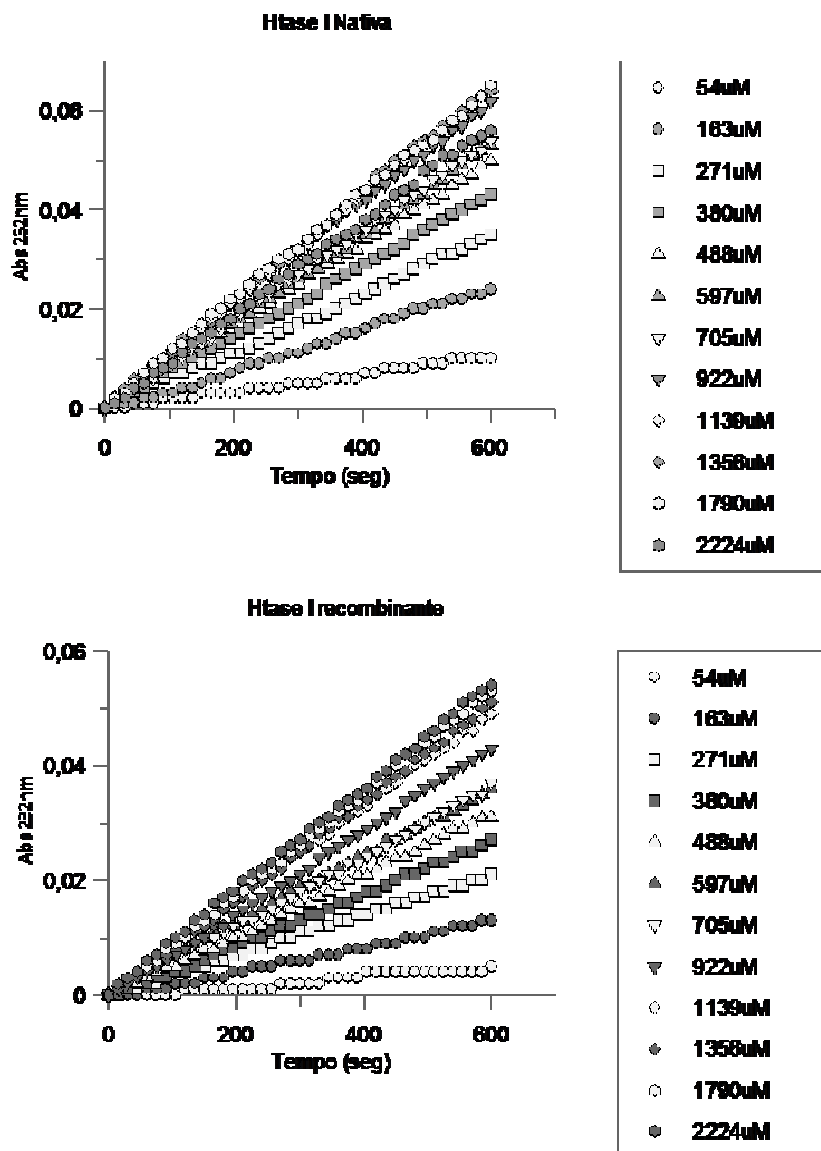


Figura 34. Formação de produtos insaturados pela Htase I.

Heparitinase I (Htase I) foi incubada com diferentes concentrações de HS a 30°C, em tampão EDA 0,1M, pH 7.0 e a formação de produtos, monitorada pela absorção a 232 nm. O gráfico foi plotado usando o programa de análise (GraFit V. 5.0, Erithacus Software).

A formação de produtos contendo ácido urônico insaturado foi diretamente proporcional ao tempo de reação. Estes dados foram utilizados para calcular os valores de velocidade de formação de produto, correspondente à velocidade instantânea, porque nos ensaios foi usado excesso de substrato, e seu consumo não passou de 5%. Os valores foram expressos em absorbância por segundo (Abs / seg) (Figura 35).

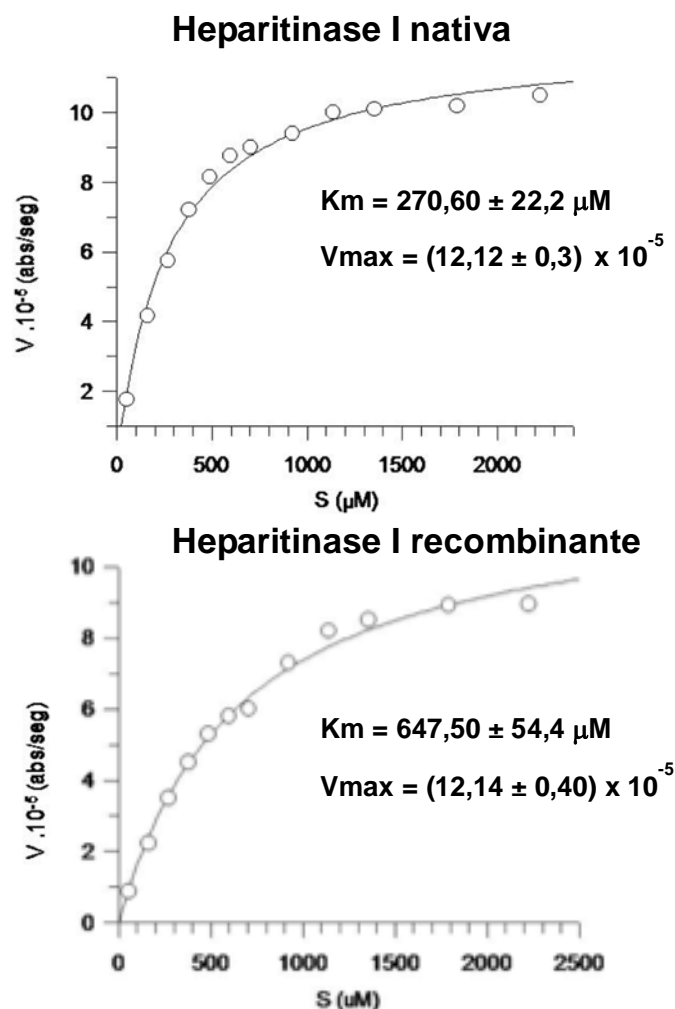


Figura 35. Velocidade de reação enzimática em função da concentração de heparam sulfato.

HS foi incubado com Htase I em tampão EDA 0,1M, pH 7.0, a 30°C por 10 min. A formação de produtos insaturados foi monitorada por absorção a 232 nm.

A curva de velocidade de formação de produto em função da concentração do substrato fornece os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$ pela equação de Henri-Michaelis-Menten em equilíbrio rápido e foram calculados usando o programa computacional de análise GraFit V. 5.0 (Erithacus Software Ltd).

Htase I nativa e recombinante apresentaram diferentes valores de K_m da mesma ordem de grandeza, 270,6 μM e 647,5 μM respectivamente. No entanto, para a enzima recombinante há uma diminuição da ordem de 2,4 vezes na afinidade da enzima recombinante pelo substrato.

5. Estudos cinéticos da heparinase

A clonagem de heparinase foi feita utilizando-se o sistema pEt 14b, com o qual a proteína é expressa e localizada no citoplasma. A purificação neste sistema é mais trabalhosa, porque a enzima está misturada com diversas proteínas citoplasmáticas, além de estar sujeita a empacotamento em corpos de inclusão e insolubilização. Pensando nisso, e ainda no fato de que a enzima, por ser bastante lábil, pode perder atividade enzimática se neste processo, heparinase foi expressa em uma cepa de bactéria (*Escherichia coli* Rosetta-gami, DE3) contendo três plasmídeos que codificam chaperonas, proteínas capazes de ajudar o dobramento correto de outras proteínas recém sintetizadas ou restaurar sua conformação, preservando suas pontes dissulfeto. Por isso, o rendimento da expressão de heparinase (10%) foi mais alto do que de heparitinase I (1-2%). Esta enzima recombinante foi utilizada para estudo dos mecanismos envolvidos na degradação de heparina.

5.1. Efeito do Ca^{2+} sobre atividade da heparinase

A participação de Ca^{2+} na catálise da heparinase tem sido estudada por vários autores, levando por vezes a contradições. Godavarti e Sasisekharan (1996) observaram a presença de um sítio de ligação ao cálcio em estudo da sequência primária da heparinase. Estudos de N.M.R. demonstraram que cátions bivalentes como Ca^{2+} podem se ligar aos grupos carboxilato do anel de ácido α -L-idurônico de heparina (Dietrich, Silva & Michelacci, 1973; Van Boeckel, et al., 1987). Liu et al. (1999) realizaram mutações em dois sítios de ligação ao cálcio em heparinase, CB-1 (*calcium binding 1* - resíduos 207-219) e CB-2 (*calcium binding 2* - resíduos 373-384). As mutações em CB-2 diminuíram em 10 vezes a atividade enzimática, enquanto que em CB-1 a diminuição foi de, no máximo, 5 vezes. Os autores sugeriram que Ca^{2+} atuaria como um ácido de Lewis interagindo diretamente com os grupos carboxílicos aniônicos do substrato, o que diminuiria suficientemente sua constante de dissociação ácida (pKa) da carboxila de tal forma que a abstração do próton- α pudesse ser realizada por um aminoácido básico da enzima. Os mesmos autores

observaram que mesmo com a perda da ligação do Ca^{2+} à enzima, heparinase era ainda capaz de se ligar à heparina. Ainda, os estudos de dicroísmo circular mostraram que a ligação de Ca^{2+} não muda a conformação da enzima. Contudo, Han et al (2009) em estudos com a heparinase de *B. thetaiotaomicron* envolvendo mutagênese e difração de raio X propuseram que Ca^{2+} funciona na organização dos resíduos que participam da ligação do substrato, garantindo a integridade estrutural da enzima, e não tem função direta na catálise.

Para estudar o comportamento enzimático na presença deste cátion, foi realizada cinética relacionando a concentração de Ca^{2+} com a formação de produto de heparina pela ação da heparinase detectados por UV. A reação foi feita em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,0, a 30°C, em concentrações variáveis de Ca^{2+} (0 – 2 mM) e concentração fixa de heparina (10 μM). A Figura 36 mostra que adição de Ca^{2+} até 2 mM é capaz de ativar heparinase. Por outro lado, adição de EDTA inibe estequiometricamente a atividade enzimática em presença de cálcio (1mM EDTA para 2 mM de Ca^{2+}).

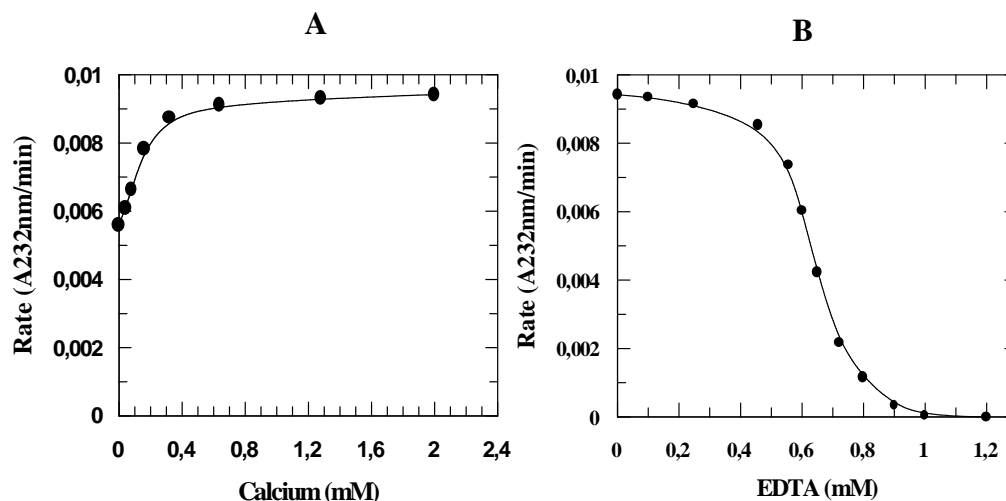


Figura 36. Efeito do Cálcio sobre atividade da heparinase.

(A) Efeito da adição de cálcio (0 – 2 mM) em 30°C. (B) Efeito da adição de EDTA na atividade da heparinase. Heparinase foi pré-incubada com 10 μM de heparina a 30 °C na presença de 2 mM CaCl_2 .

A adição de Ca^{2+} após adição de EDTA restaura a atividade da heparinase (dado não mostrado). Esses dados sugerem que EDTA não afeta a heparinase, mas que, por ser um quelante de Ca^{2+} , remove-o do sistema enzimático, levando à velocidade zero. Os resultados observados na Figura 36 mostram que cálcio é um ativador essencial para heparinase. A Figura 37 relaciona a concentração de heparina com a taxa de formação de produto, nas mesmas condições do experimento anterior. O dados mostram que para concentração de cálcio acima de 200 μM não há variação da atividade enzimática. Porém, com concentração do substrato alto ($>5\mu\text{M}$) houve uma diminuição da velocidade instantânea da reação para concentração de cálcio menor que 50 μM , sugerindo que heparina não complexada com cálcio esteja agindo como um inibidor competitivo. Por outro lado, em baixas concentrações de substrato ($<2\mu\text{M}$), mesmo em baixa concentração de cálcio, as velocidades instantâneas tendem a se igualar aos valores de cálcio saturante (2 mM), indicando que o íon cálcio livre não age sobre a enzima, e sim sobre o substrato, fazendo com que o complexo heparina-cálcio seja o verdadeiro substrato da enzima heparinase.

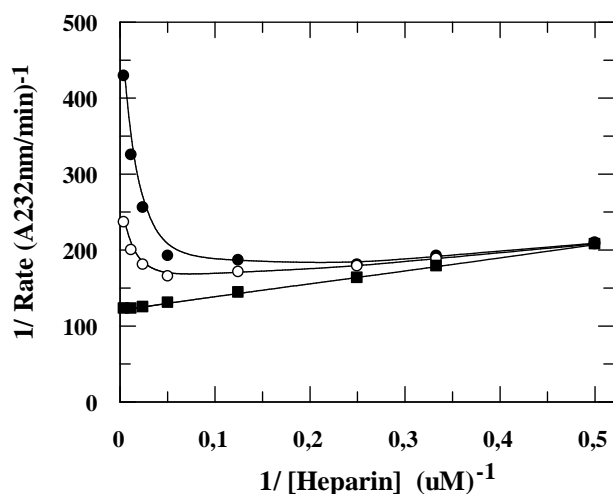


Figura 37. Plote de Lineweaver-Burck da influência de cálcio na atividade da heparinase com aumento de concentrações de heparina.

Concentrações de cálcio: 25 μM (●-●), 50 μM (○-○) e 200 μM (■-■).

Os dados cinéticos fornecem o valor de $K_S = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$, calculado por regressão não linear usando o programa GraFit V. 5.0 (Erithacus Software Ltd), baseado nos dados da Figura 37.

Nossos resultados estão de acordo com os observados por Han et al., (2009) que relacionam a função do íon cálcio com a coordenação dos resíduos de heparinase que participam da ligação do substrato. Os autores observaram que sem a ligação do Ca^{2+} a enzima não foi capaz de ligar-se a oligossacarídeos de heparina. Nossos dados sugerem que o polímero de heparina intacto se liga à heparinase em carência de Ca^{2+} , porém a enzima não degrada heparina por não ligar o substrato de tal forma que a região de clivagem da heparina esteja favoravelmente posicionada no sítio ativo da enzima.

5.2. Estudo da especificidade estrutural da heparinase pelo substrato

Para estudo da especificidade da heparinase sobre heparina foram feitas modificações químicas da molécula de heparina e avaliada a atividade enzimática pelo cálculo dos valores da constante de dissociação, utilizando o programa GraFit V. 5.0 (Erithacus Software Ltd) (Tabela IV). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, a 30°C, com 5 mM de CaCl_2 , em presença de diferentes concentrações fixas de heparinas modificadas.

Tabela IV. Constante de Dissociação da Heparinase para derivados da Heparina

Composto	Constantes de Dissociação (μM)
Heparina- Ca^{2+}	$K_S = 1.4 \pm 0.1$
HepCarb-Red	$K_I = 0.08 \pm 0.01$
HepIdoA,2-des	$K_I = 2.8 \pm 0.3$
HepGalA	$K_I = 2.3 \pm 0.2$
HepNAc	Sem inibição

HepCarb-Red, heparina carboxi-reduzida; HepIdoA,2-des, heparina dessulfatada na posição 2 do ácido idurônico. HepGalA, heparina ácido idurônico dessulfatada seguida de epimerização a ácido galacturônico; HepNAc, heparina N-dessulfatada-N-acetilada.

Os resultados mostraram que a eliminação permanente da carga negativa do grupo carboxila do anel uronato de heparina (HepCarb-Red, $K_i = 0.08 \pm 0.01 \mu\text{M}$) não impede sua ligação ao sítio ativo da enzima, mas afeta sua catálise. Também, dessulfatação específica em ácido α -L-idurônico (HepIdoA,2-des) ou dessulfatação do ácido α -L-idurônico, 2-O-sulfato seguido de epimerização do ácido idurônico para ácido galacturônico (HepGalA) acaba com a degradação enzimática, levando à formação de um inibidor competitivo para heparinase. A constante de dissociação observada para hepIdoA,2-des foi $K_i = 2.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$, e para hepGalA foi $K_i = 2,3 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Os dados mostram claramente que o grupo 2-O-sulfato do ácido idurônico da heparina é essencial para catálise da heparinase, e a posição axial ou equatorial do grupo hidroxila de C3 do ácido L-idurônico 2-O-sulfatado não é determinante para ligação à heparinase.

A N-dessulfatação seguida de N-acetilação da heparina (HepNAc) extingui totalmente a capacidade de ligação à enzima, provavelmente por induzir mudança de conformação na glucosamina, como proposto previamente (Desai, Wang, & Linhardt, 1993; Van Boeckel, et al., 1987).

Nader et al., (1999b) investigaram a especificidade da heparinase empregando heparinas quimicamente modificadas e heparosam (K5 de *E. coli*) com diferentes sulfatações. Os resultados mostraram que a enzima cliva exclusivamente ligações contendo glucosamina N-sulfato e ácido- α -L-idurônico 2-O-sulfato. A glucosamina pode ou não estar sulfatada em C3 e/ou C6. No entanto, o resíduo de ácido idurônico deve estar sulfatado em C2. A enzima não age sobre ligações contendo ácido β -D-glucurônico apresentando ou não sulfatação.

5.3. Efeito da temperatura sobre atividade da heparinase

A energia mínima necessária para que possa ocorrer catálise é definida como energia de ativação (E_a) e sua determinação foi feita pelo estudo do

efeito da temperatura na catálise da heparinase. A enzima foi incubada com 10 μ M de heparina, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, em presença de 10 mM de CaCl_2 , em várias temperaturas. Ea foi medida pelos dados obtidos do experimento que gerou o gráfico da Figura 38, o qual mostra a variação da constante catalítica ($k_{\text{cat}} = V_{\text{máx}} / [E]$, onde $[E]$ é a concentração de enzima) em função da temperatura.

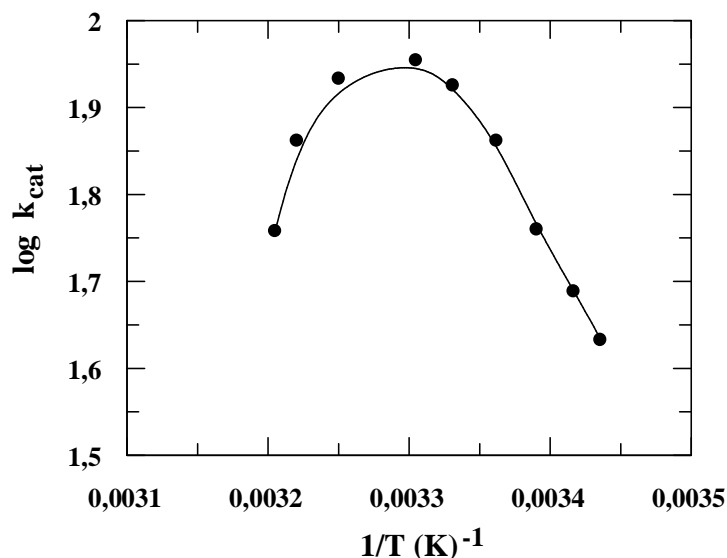


Figura 38. Efeito da temperatura na catálise da heparinase.

Heparinase foi incubada com 10 μ M de heparina, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, em presença de 10 mM de CaCl_2 , em várias temperaturas. A enzima perde atividade subitamente a temperaturas acima de 35 °C indicando inativação da enzima.

Os valores de Ea_{cat} (energia de ativação do processo de catálise) e Ea_{denat} (energia de ativação no processo de desnaturação) foram calculados, considerando duas reações a temperaturas diferentes, utilizando os dados do gráfico da Figura 38 aplicados à equação de Arrhenius, descrita em Métodos.

Assim, $Ea_{\text{cat}} = 13 \pm 1$ kcal/mol. Uma súbita perda de atividade pode ser observada, indicando inativação da enzima a temperaturas acima de 35°C em função do tempo. A energia de ativação observada nesse processo de desnaturação é de $Ea_{\text{denat}} = 88 \pm 5$ kcal/mol (Figura 39). A velocidade de desnaturação térmica foi obtida pelo gráfico do logaritmo do percentual da

atividade remanescente (Kobs) em função do tempo e da temperatura.

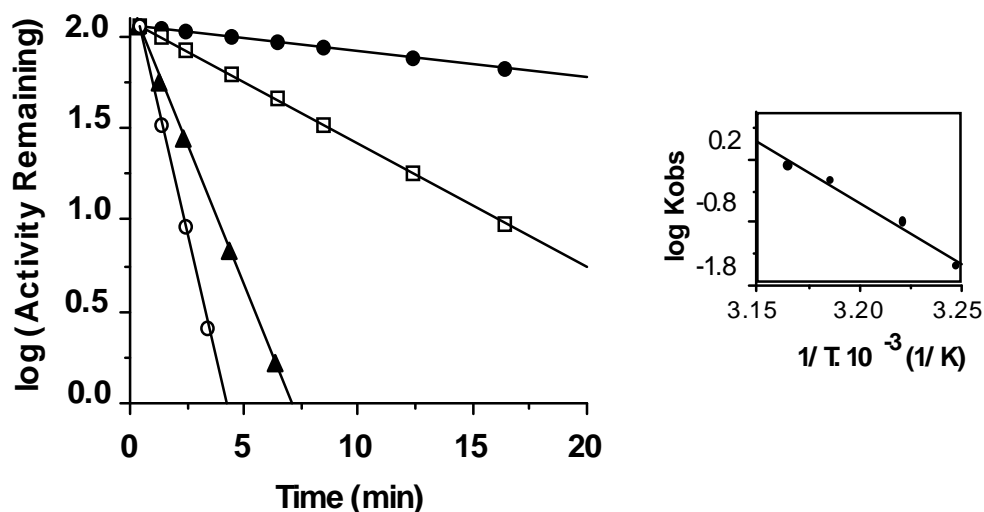


Figura 39. Inativação da heparinase a diferentes temperaturas em função do tempo e da temperatura de incubação.

Heparinase foi pré-incubada a temperaturas desnaturantes de (●-●: 35°C; □-□: 37.5°C; ▲-▲: 41°C; ○-○: 43°C). A atividade residual da heparinase foi medida a 25°C. O quadro ao lado mostra o plote de Arrhenius do processo de desnaturação térmica da heparinase, para obtenção da energia de ativação do processo de desnaturação.

Os dados mostraram que em temperaturas abaixo de 35°C, a velocidade de desnaturação é muito lenta quando comparada com a velocidade catalítica da heparinase. Desde que a energia de ativação da desnaturação ($E_{a_{denat}} = 88 \pm 5$ kcal/mol) é maior que a da catálise ($E_{a_{cat}} = 13 \pm 1$ kcal/mol), a taxa de desnaturação aumenta mais rápido do que a taxa de catálise com o aumento da temperatura, razão pela qual a temperaturas acima de 35°C a taxa de desnaturação predomina sobre a da catálise.

A observação do efeito da temperatura sobre a catálise de heparinase sugere que a β -eliminação se processa em um único passo limitante, já que não foi observada nenhuma transição de fase no plot de Arrhenius abaixo de 35 °C (Figura 38). A abstração do próton em C5 dos resíduos do ácido α -L-idurônico catalisada por uma base parece ser o único passo limitante para catálise.

5.4. Efeito do pH sobre atividade da heparinase

O sítio ativo das enzimas é composto por grupamentos ionizáveis responsáveis pela manutenção da conformação do centro catalítico, ligação ao substrato e catálise.

Para estudo dos grupos prototrópicos da heparinase, as reações cinéticas foram realizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (meio ácido) ou tampão acetato de sódio 50 mM (meio básico), força iônica de 0,05, em presença de 10 mM de CaCl_2 , a 30°C e pH variando de 4.5 - 9.5. Os valores de pKa dos grupos prototrópicos do sítio ativo da heparinase foram determinados pela medida pH-dependente de k_{cat}/K_S , k_{cat} e K_S . Os dados dependentes de pH de k_{cat}/K_S e k_{cat} e da influência de pH sobre $1/K_S$ foram analisados de acordo com as equações descritas em Métodos e pelo programa GraFit V. 5.0, (Erithacus Software Ltd).

O perfil de k_{cat}/K_S observado na Figura 40A fornece os valores de pKa dos grupos prototrópicos da enzima livre (pK_E). Foi observado que dois grupos prototrópicos (pK_{E1} e pK_{E2}) ionizam no sítio ativo da heparinase a 30°C. O primeiro grupo apresentou $pK_{E1} = 5.48 \pm 0.05$ e o segundo grupo, $pK_{E2} = 7.85 \pm 0.05$. O $pH_{ótimo}$ observado foi 6.67 ± 0.05 .

Para estudar a influência da ligação do substrato sobre valores de pKa (pK_{ES}), foi estudado o efeito do pH sobre a catálise da enzima (Figura 40B). Os dados mostraram que a ligação da heparina à heparinase não muda significativamente os valores de pK_{E1} ($pK_{E1} = pK_{ES1}$), porém, a presença de heparina induziu um grande aumento de pK_{E2} de 7.85 para 8.82 (Tabela V).

O gráfico $1/K_{Sap}$ versus pH (Figura 40C) mostra o efeito do pH na constante de dissociação da heparinase. As conclusões foram que valores de K_S são constantes em $pH < 7.0$. De acordo com o gráfico e a equação 2 acima, quando $[H^+]$ aumenta para o infinito, K_{Sap} aproxima-se do valor de K_S . $K_{ES1}/K_{E1} = \alpha K_S$, produzindo um K_S verdadeiro ($K_S = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $\alpha = 1.0$). Quando $[H^+]$ diminui para o infinito, a afinidade da enzima à heparina também diminui para o infinito, com um valor de $\beta = 9.8 \pm 0.6$, isto é, $\beta K_S = 14 \pm 2 \mu\text{M}$.

Desde que a ionização da heparina não mude em pH acima de 7.0, essa alteração de afinidade pode ser atribuída à desprotonação de um aminoácido básico importante da enzima relacionado com a ligação do substrato.

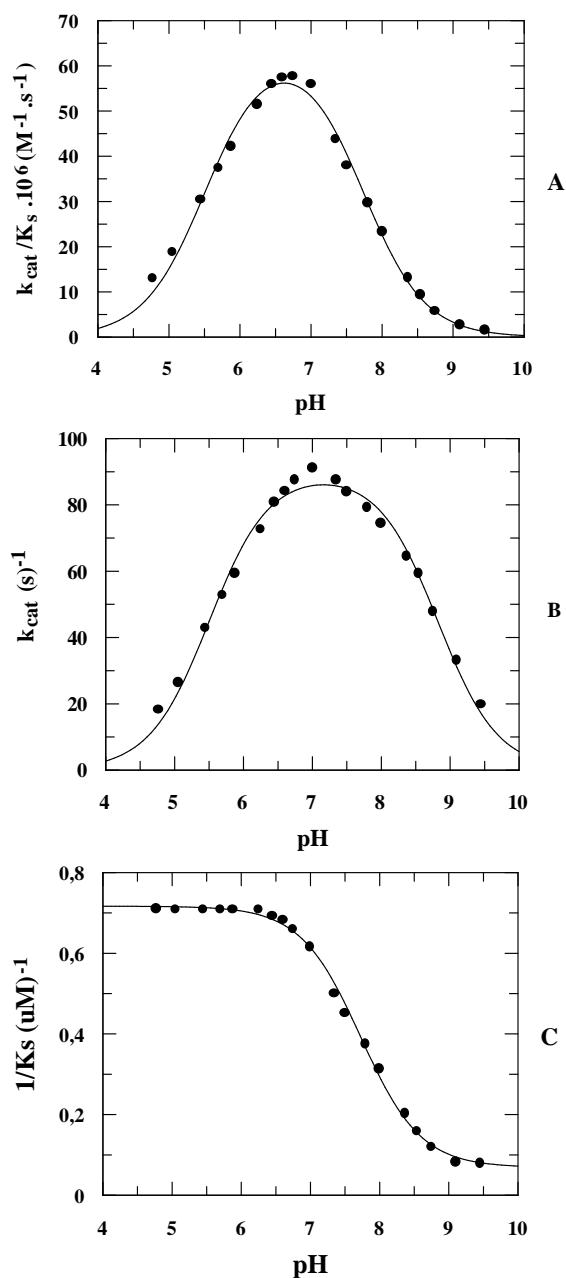


Figura 40. Efeito do pH na atividade da Heparinase.

Efeito do pH sobre a atividade da heparinase foi medido em tampão Tris-HCl 50 mM (meio ácido) ou acetato de sódio 50 mM (meio básico), com pH variando de 4.50-9.50, em presença

de 10mM CaCl_2 a 30 °C. (A) Os grupos prototrópicos presentes no sítio ativo de heparinase (pK_{E1} e pK_{E2}) foram determinados pelo perfil $k_{\text{cat}}/K_{\text{S}}$. (B) O efeito da ligação do substrato no sítio ativo da enzima foi analisado pela determinação dos valores de pK_{ES} através da variação da constante catalítica em função do pH. (C) Efeito do pH na constante de dissociação ($1/K_{\text{sap}}$).

Tabela V. Valores termodinâmicos e de pKa dos grupos prototrópicos do sítio ativo da heparinase.

	pKa (25°C)	$\Delta\text{H}_{\text{ion}}$ (kcal/mol)	$\Delta\text{S}_{\text{ion}}$ (cal/mol.K)
pK_{E1}	5.48 0.05	$\pm +7.2 \pm 0.2$	-0.8 ± 0.3
pK_{ES1}	5.45 0.05	$\pm +7.3 \pm 0.2$	-0.7 ± 0.3
pK_{E2}	7.85 0.05	$\pm +6.8 \pm 0.4$	-13 ± 2
pK_{ES2}	8.82 0.03	$\pm +6.8 \pm 0.3$	-18 ± 1

Os dados do estudo dos grupos prototrópicos demonstram que três formas da enzima são mostradas ($\text{E}^{\text{n}+1}$, E^{n} and $\text{E}^{\text{n}-1}$) de acordo com o pH. A forma $\text{E}^{\text{n}+1}$ refere-se à heparinase com o sítio ativo ionizado positivamente em pH ácido; E^{n} refere-se à heparinase com o sítio ativo não ionizado ou sem carga efetiva em pH neutro; e $\text{E}^{\text{n}-1}$ representa o sítio ativo da enzima negativamente carregado em pH básico. Todas as formas de heparinase podem se ligar à heparina, mas somente a enzima em pH neutro (E^{n}) é cataliticamente ativa, as formas ($\text{E}^{\text{n}+1}$) e ($\text{E}^{\text{n}-1}$) não são produtivas. Assim, nossos resultados sugere um modelo de catálise diprótico de equilíbrio rápido, no qual a troca de prótons com conseqüente clivagem eliminativa ocorre em pH neutro (Figura 41).

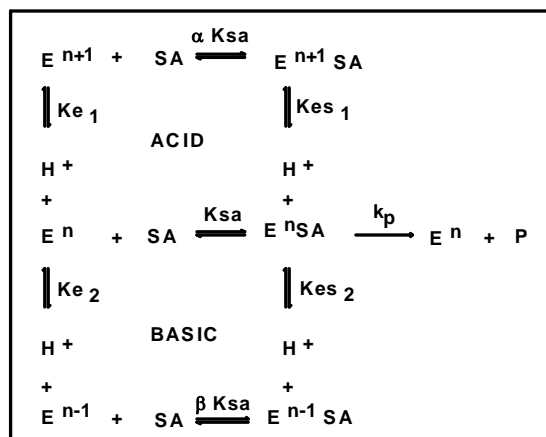


Figura 41. Modelo diprótico de equilíbrio rápido para o sítio ativo da heparinase.

Uma vez obtido os valores dos pKa, é possível calcular as funções termodinâmicas características de cada grupo prototrópico do sítio ativo (variação de entalpia - ΔH ; variação de entropia - ΔS) pela influência da temperatura nas constantes de dissociação (Tabela V). Para isso, foi utilizada a equação de Van't Hoff, apresentada em Métodos.

De acordo com as propriedades termodinâmicas, o grupo ionizável responsável pelo valor de $pK_{E1} = 5.48 \pm 0.05$ é um grupo catiônico, provavelmente uma histidina cataliticamente ativa com $\Delta H_{ion} = 7.3 \pm 0.2$ kcal/mol e $\Delta S_{ion} = -0.7 \pm 0.3$ cal/mol.K (Maurel, & Douzou, 1975). Basicamente, a ligação de heparina não afeta as propriedades termodinâmicas desse grupo. O valor baixo de pKa observado para essa histidina provavelmente reflete seu meio positivamente carregado descrito por outros autores (Sasisekharan et al, 1996; Godavarti et al., 1996). Por outro lado, os valores termodinâmicos obtidos para o grupo pK_{E2} não permite precisar a identificação do segundo grupo prototrópico do sítio ativo da heparinase. Os valores de $pK_{E2} = 7.85$, $\Delta H_{ion} = 6.8 \pm 0.4$ kcal/mol, $\Delta S_{ion} = -13 \pm 1$ cal/mol.K não são conclusivos, sugerindo a presença ou de um resíduo de tirosina ou de histidina. A ligação da heparina à heparinase induziu um grande aumento de pK_{E2} de 7.85 para 8.82 e a entropia de ionização de -13 to -18 cal/mol.K sem mudança de entalpia de ionização. A magnitude altamente negativa da entropia observada para ionização de pK_{E2}

indica a ionização de um ácido neutro como mostrado por um grupo fenol de um resíduo de tirosina (Findlay, Mathias, & Rabin, 1962).

5.5. Efeito de solventes orgânicos sobre valores de pKa da heparinase

Para analisar a natureza da carga elétrica presente no centro ativo da heparinase, foi feito um estudo da atividade da enzima em função da presença de solventes orgânicos. Estudos prévios revelaram que a presença de solventes orgânicos aumenta os valores de pKa em ácidos neutros (carboxila, sulfidril e grupos fenólicos), enquanto diminui ou não muda os valores de pKa de grupos catiônicos (resíduos de amina e histidina). O tamanho da perturbação observada é dependente da natureza do solvente orgânico e da polaridade da forma neutra do ácido (Grace e Dunaway-Mariano, 1983). O método de perturbação objetiva distinguir entre ionizações de resíduos de ácidos neutros e de ácidos catiônicos, baseados na diferença de seus comportamentos em sistemas contendo solventes orgânicos e água misturados (Findlay, Mathias & Rabin, 1962).

A Tabela VI relaciona a magnitude de perturbações pK_{E1} e pK_{E2} por dioxano, etanol e acetonitrila.

Tabela VI. Perturbações dos valores de pK_a do sítio ativo da heparinase por solventes orgânicos

Grupos Ionizáveis	Valores de pK_a (25 °C)			
	Água	Dioxano (7.5%)	Etanol (20%)	Acetonitrila (20%)
pK_{E1}	5.48 ± 0.05	5.48 ± 0.05	5.46 ± 0.05	5.45 ± 0.05
pK_{ES1}	5.45 ± 0.05	5.44 ± 0.05	5.46 ± 0.05	5.45 ± 0.05
pK_{E2}	7.85 ± 0.05	>8.85	8.18 ± 0.05	8.20 ± 0.05
pK_{ES2}	8.8 ± 0.03	>9.82	8.85 ± 0.03	9.15 ± 0.04

A presença de dioxano 7.5% (composto aprótico apolar), etanol 20% (composto prótico polar) ou acetonitrila 20% (composto prótico apolar) não muda significativamente os valores de pK_{E1} e pK_{ES1} ; etanol muda o pK_{E1} de 5.48 ± 0.05 para 5.46 ± 0.05 ($\Delta pK = -0.02 \pm 0.05$) e acetonitrila para 5.45 ± 0.05 ($\Delta pK = -0.03 \pm 0.05$), mostrando uma pequena diminuição sobre o valor de pK_a ; dioxano 7.5% não muda pK_{E1} . Nenhuma influência da ligação da heparina sobre pK_{E1} foi observada na perturbação pelo solvente. Estes dados estão de acordo com a perturbação observada para um ácido catiônico, corroborando com os valores termodinâmicos medidos para pK_{E1} , que descreve apropriadamente a presença de imidazol do resíduo de histidina envolvida na catálise da heparinase. Por outro lado, dioxano, etanol e acetonitrila induziram um aumento significativo nos valores observados de pK_{E2} . Etanol muda o pK_{E2} de 7.85 ± 0.05 para 8.18 ± 0.05 ($\Delta pK = +0.33 \pm 0.05$), acetonitrila para 8.20 ± 0.05 ($\Delta pK = +0.35 \pm 0.05$) e dioxano 7.5% induziu um grande aumento em pK_{E2} o qual não pode ser mensurado exatamente por causa da grande mudança promovida pelo dioxano, $\Delta pK > +1$, já que heparinase é instável a $pH > 9.6$. É importante notar que a presença de substrato no sítio ativo da heparinase diminui a perturbação sobre valores de pK_{ES2} , ΔpK do etanol diminuiu de 0.33 para 0.03 e ΔpK de acetonitrila de 0.35 para 0.16. O comportamento de ionização observado para pK_{E2} sobre solventes orgânicos é típico de um ácido neutro, compatível com a ionização do grupo fenol do resíduo de tirosina. Os dados sugerem o envolvimento de resíduos de tirosina e histidina envolvidos por um ambiente com aminoácidos básicos na catálise da heparinase.

5.6. Efeito da relação D_2O/H_2O na atividade da Heparinase

Para avaliar o perfil do mecanismo de troca de próton, foi demonstrado o efeito do isótopo da água (D_2O) sobre a atividade da heparinase, em um sistema de solvente binário D_2O/H_2O . Uma equação geral foi proposta para representar as funções cinéticas que governam a expressão do efeito de um isótopo sobre a velocidade máxima da reação catalisada pela enzima:

$$V_n = V_H (1 - n + n\phi_1)$$

A equação acima mostra a variação da catálise (V_{max}) da heparinase em função da quantidade prótons envolvidos no processo (Northrop, 1981). A Figura 42 revela que a velocidade da reação diminui de forma inversamente proporcional ao aumento da taxa de deutério do solvente, exibindo uma esteoquiométrica de 1:1. Os resultados mostram que apenas um próton está envolvido no mecanismo de catálise da heparinase ($n=1.0$), esse próton pode ser trocado com o deutério do solvente inibindo a reação. Dados da literatura (Han et al., 2009) sugerem que esse próton pode ser doado para o "leaving group" da GlcNAc6S da ligação glicosídica durante o processo de β -eliminação por um resíduo de Tyr 357 do sítio catalítico da heparinase.

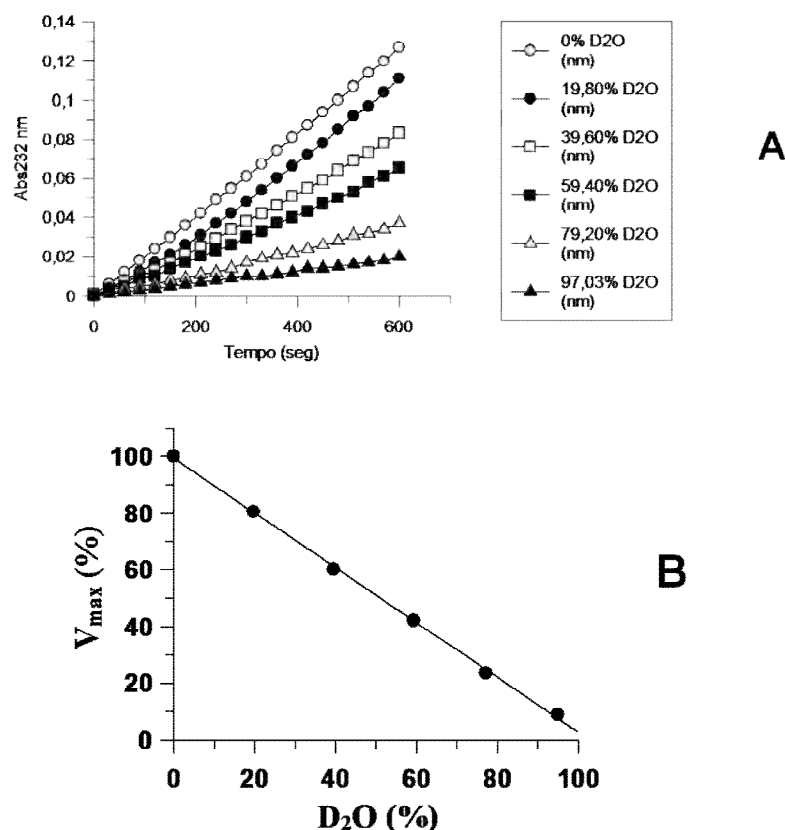


Figura 42. Efeito do isótopo D₂O na atividade da Heparinase.

Atividade da heparinase sobre heparina foi determinada na presença de 1085 μ M de heparina, 10mM Ca^{2+} em 50 mM de HEPES, pH 7.0, preparado em meio com taxas crescentes de D₂O/H₂O, a 30°C. V_{max} pode ser calculado a cada taxa de D₂O/H₂O, de acordo com a equação: $V_n = V_H (1 - n + n\phi_1)$ (Enyedy & Kovach, 2004). **A.** Liberação de produtos de degradação da heparina pela heparinase em função do tempo, em diferentes taxas de D₂O. **B.** Velocidade máxima de reação em função da porcentagem de D₂O no meio.

5.7. Efeito da mutação sítio dirigida de H165A e Q163A na atividade da heparinase

5.7.1. Atividade específica

Para estudar a participação de aminoácidos envolvidos na catálise de heparinase de *F. heparinum* e relacionar com os resíduos essenciais descritos para a atividade da enzima de *B. thetaiotaomicron* (Han et al., 2009), foram realizadas duas mutações sítio dirigidas, uma em histidina 165 e outra em glutamina 163 de heparinase de *F. heparinum*, os quais correspondem à His151 e Gln149 de *B. thetaiotaomicron*, respectivamente (Figura 29). A escolha foi baseada no envolvimento direto desses resíduos na catálise de heparinase de *B. thetaiotaomicron*, no alinhamento nas sequências de aminoácidos das duas enzimas e na conservação dos aminoácidos na região do sítio ativo (Figura 29). His151 foi referida como a base que abstrai o próton de C5 em *B. thetaiotaomicron* e Gln149, como resíduo que participa da ligação do íon cálcio à enzima. Os resíduos foram mudados para alanina utilizando-se *primers* degenerados.

As heparinases mutantes (Mut H165A e Mut Q163A) foram expressas em sistema pEt 14b e purificadas como descrito em Métodos para heparinase selvagem. As enzimas foram ensaiadas quanto a atividade específica (Figura 43) e cinética em diferentes pHs (Figura 44). A atividade específica para a enzima selvagem (5×10^{-7} OD_{230nm}/μg.s) e mutadas (MutH165A, $5,4 \times 10^{-7}$ OD_{230nm}/μg.s) e MutQ163A, $4,9 \times 10^{-7}$ OD_{230nm}/μg.s) foi mantida.

Han et al. (2009) observaram que heparinase de *B. thetaiotaomicron* mutada em His151A e Q149A perdeu 100% da atividade enzimática. Porém, em heparinase de *F. heparinum* as duas mutantes mantiveram suas atividades específicas semelhantes à da enzima selvagem, quando ensaiadas nas mesmas condições e quantidades de enzima (Figura 43). A atividade específica da heparinase selvagem foi de 0,50 Abs/g.seg; a da Mut His165 foi de 0,54 Abs/g.seg; e a da Mut Q163 foi de 0,49 Abs/g.seg. Um dado curioso foi que a enzima mutante em His 165 mostrou uma atividade levemente aumentada em comparação com a enzima selvagem. Aparentemente H165 e

Q163 não mostraram ser essenciais à catálise, ou tiveram sua função catalítica substituída por outro aminoácido básico do sítio ativo. Godavarti e Sasisekharan (1998) e Liu et al. (1999) propuseram que a função de base para heparinase de *F. heparinum* seria realizada pelo resíduo de Cys135. Contudo, Han et al (2009) descrevem um mecanismo cujo resíduo básico é a His151 e descarta a participação de cisteína na catálise. Diante dos resultados da mutação, His165 não é essencial para a catálise da heparinase de *F. heparinum*, o que vai contra ao alto grau de conservação das duas sequências de aminoácido (64% de identidade) e mais especificamente do sítio ativo dessas enzimas.

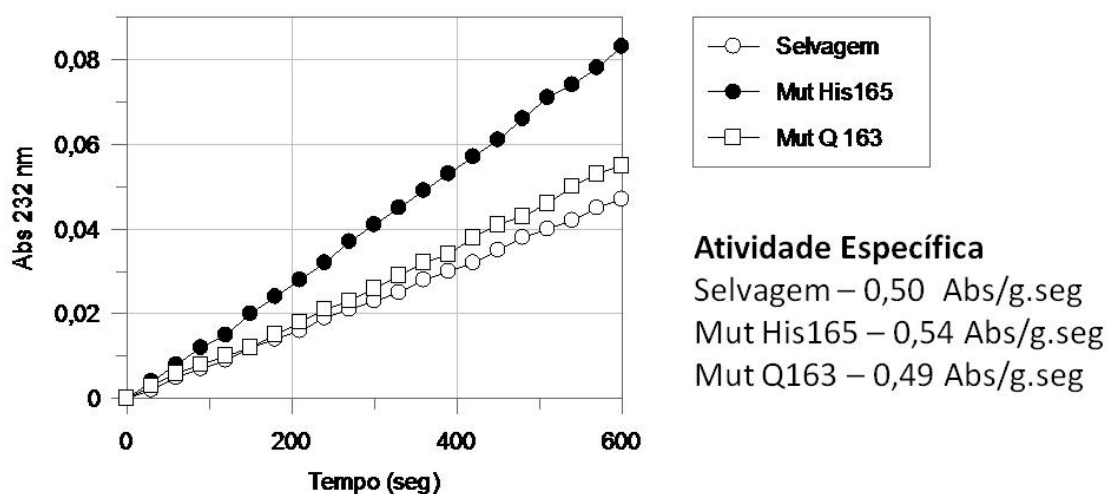


Figura 43. Atividade específica da heparinase selvagem e seus mutantes em H165A e G163A.

Os testes cinéticos foram ensaiados na presença de 1085µM de heparina, 170 ± 10 µg/mL de proteína do extrato de *E. coli*, 10mM Ca^{2+} , em 50 mM de HEPES, pH 7,0, a 30°C. A atividade específica das três enzimas não sofre alteração significativa. Selvagem, heparinase recombinante selvagem; MutH165A, heparinase recombinante com mutação na Histidina 165; MutQ163A, heparinase recombinante com mutação na Glutamina 163.

5.7.2. Efeito do pH na atividade de heparinase recombinante selvagem e mutantes H165A e Q163A

Com o objetivo de analisar e comparar os perfis de catálise da heparinase selvagem e mutante em diferentes pHs, foram realizados ensaios de cinética para o cálculo da velocidade da reação em função do pH para a enzima selvagem e mutantes. As reações foram feitas em tampão HEPES 50 mM a 30°C, em diferentes pHs (Figura 44). As mutações realizadas na heparinase de *F. heparinum* mostraram não afetar o perfil de catálise a diferentes pHs, sugerindo que o comportamento dos grupos prototrópicos do sítio ativo da enzima não foi alterado. Godavarti et al. (1996) demonstraram que mutações em H129A, H165A e H339A não afetavam a catálise da enzima, porém H203A extinguiu completamente sua atividade, indicando a importância deste resíduo. Além disso, para diferenciar a função do resíduo H203 entre nucleofílica ou de ligação de heparina, os autores trocaram a histidina por um ácido aspártico, que pode agir como nucleófilo, porém não participa da ligação da heparina devido sua carga negativa. Esta mutação gerou uma enzima com atividade residual (redução do k_{cat} de 30 vezes) sugerindo uma função nucleofílica para o resíduo.

O presente estudo mostra que em pH ótimo de 6,7 os aminoácidos catalíticos de heparinase não estão ionizados. O anel imidazólico de um resíduo de histidina está desprotonado e um grupo fenol está protonado no sítio ativo de heparinase. Assim, o grupo fenol protonado ($pK_{E2} = 7.85$) é o nucleófilo mais fraco para abstrair o próton do C5 do anel de ácido α -L-idurônico. Esse grupo protonado pode ajudar no mecanismo catalítico como um doador de próton. Por outro lado, o meio positivamente carregado do sítio ativo da heparinase determinado pela proximidade de aminoácidos básicos (Sasisekharan et al., 1996; Godavarti et al., 1996) pode aumentar o caráter básico do anel imidazólico aumentando a reatividade da histidina ($pK_{E1} = 5.48$), a qual age como uma base para abstração do próton de C5.

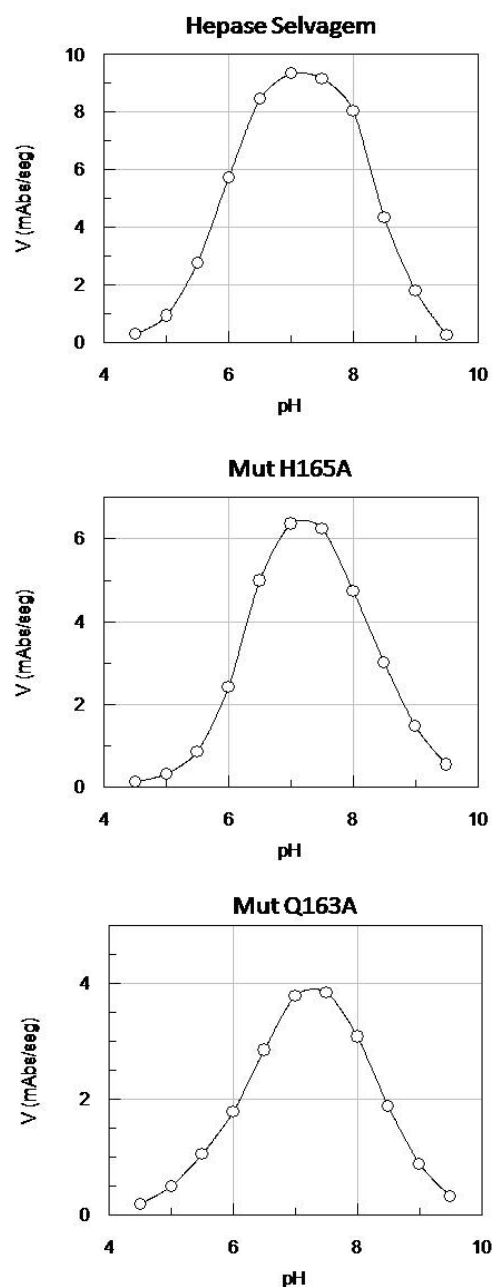


Figura 44. Efeito do pH na atividade de Mut H165A e Mut Q163A

Heparinase foi incubada com 1085 μ M de heparina em tampão HEPES 50 mM com diferentes pHs (4.50 - 9.50), na presença de CaCl_2 10 mM. Nesta figura, o perfil de catálise expresso em velocidade máxima em diferentes pHs não muda, sugerindo que os resíduos de aminoácidos mutados não são essenciais para a atividade da enzima.

6. Efeito Inibitório do condroitim sulfato super sulfatado sobre heparinase

Lotes de heparina contaminados com condroitim sulfato super sulfatado (OSCS) vêm causando graves reações adversas em pacientes submetidos a tratamentos com essa droga, tais como choque anafilático, hipotensão, taquicardia, entre outros (Kishimoto et al., 2008; Blossom et al., 2008).

A Figura 45 ilustra a presença desses contaminantes visualizada na eletroforese em gel de agarose. A presença do OSCS fica evidente inclusive na preparação de enoxaparina, uma heparina de baixo peso molecular. Essas heparinas e enoxaparinas levaram à morte de pacientes e foram recolhidas do mercado americano e europeu.

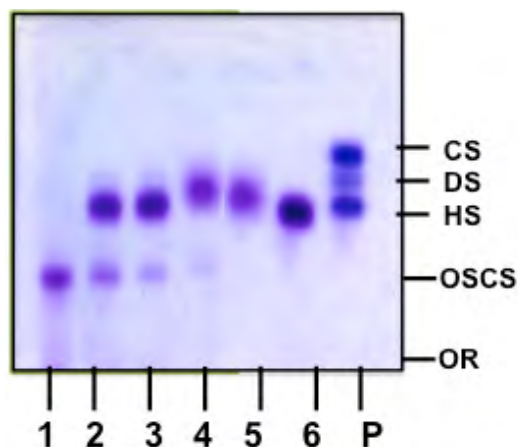


Figura 45. Comportamento eletroforético em gel de agarose de heparinas puras e contaminadas com condroitim sulfato supersulfatado.

As amostras foram aplicadas ao gel de agarose no tampão 1,3-diamino propano acetato 0.05M pH 9. Após a corrida, o gel foi seco e corado com azul de toluidina como descrito em Métodos. 1, condroitim supersulfatado (OSCS); 2, heparina Baxter lote 117050; 3, heparina Baxter lote 107031; 4, enoxaparina, lote 291; 5, enoxaparina padrão; 6, heparina não fracionada padrão; P, mistura contendo 10 mg de cada glicosaminoglicano sulfatado, heparam sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS); OR, origem.

Essas heparinas foram incubadas com heparinase e heparitinase II. A Figura 46 mostra que a presença de OSCS inibe a ação da heparinase. Por outro lado, a enzima heparitinase II é menos susceptível a inibição pelo OSCS.

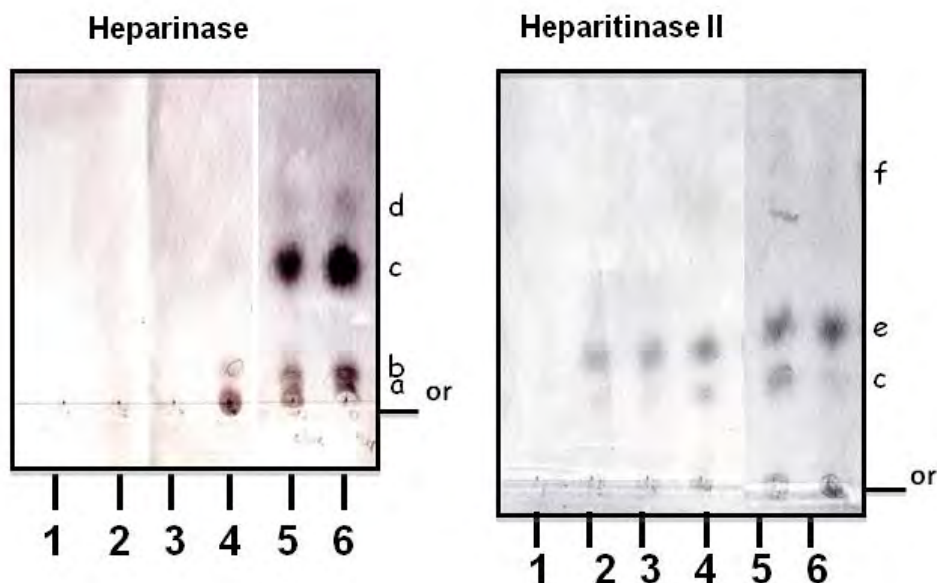


Figura 46. Ação de heparinase e heparitinase II sobre heparina e heparinas contaminadas por condroitim sulfato supersulfatado.

As amostras de heparinas foram incubadas com heparinase e heparitinase II como descrito em Métodos. Após incubação, os produtos obtidos foram separados por cromatografia descendente em papel no solvente A. Os produtos foram identificados pela absorção no UV a 230 nm, e revelados por nitrato de prata em meio alcalino. **1**, condroitim supersulfatado (OSCS); **2**, heparina Baxter lote 117050; **3**, heparina Baxter lote 107031; **4**, enoxaparina, lote 291; **5**, enoxaparina padrão; **6**, heparina não fracionada padrão; **a**, oligossacarídeos insaturados; **b**, tetrassacarídeos insaturados; **c**, dissacarídeo insaturado trissulfatado (Δ U2,SGlcNS,6S); **d**, glucosamina 2,6-dissulfatada (GlcNS,6S); **e**, dissacarídeo insaturado dissulfatado (Δ UGlcNS,6S); **f**, dissacarídeo insaturado N-sulfatado (Δ UGlcNS); or, origem

A Figura 47 compara o perfil de eluição dos produtos de degradação de heparina (100 μ g) incubada com heparinase (30 ng/mL) (Figura 47A) e com heparinase na presença de OSCS (100 μ g) (Figura 47B). A reação foi realizada em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0, a 30°C, por 18 horas.

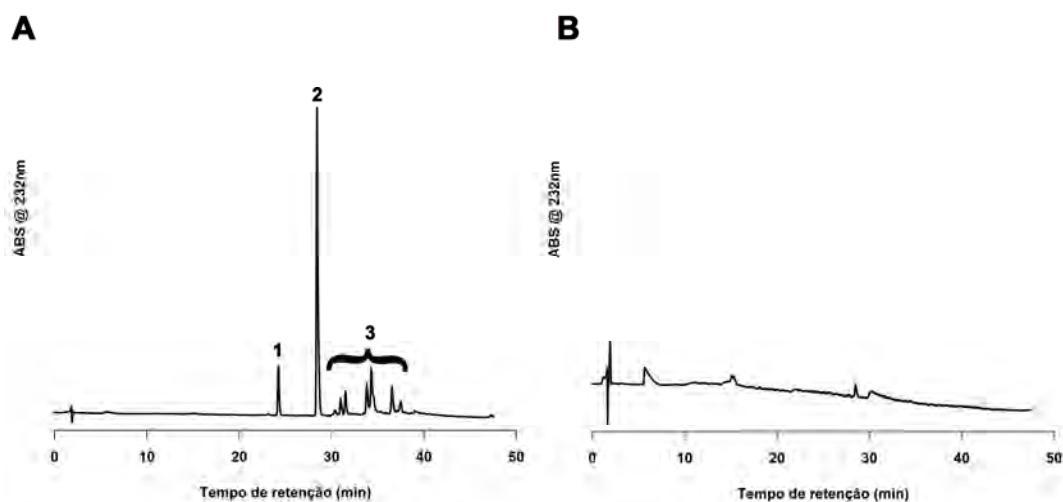


Figura 47. Formação de produtos de degradação de heparina sob ação da heparinase na ausência e presença de OSCS.

Heparina (100 μg) foi incubada com heparinase (30 ng/mL) (A) e com heparinase na presença de OSCS (100 μg) (B), em tampão HEPES 50 mM, pH 7,0, a 30°C, por 18 horas. Os produtos foram aplicados em coluna Zorbax SAX 4.6 x 150 mm, partícula de 5 μm , como descrito em Métodos. (A) Na ausência de OSCS os produtos de degradação específicos de heparina pela heparinase são formados 1. $\Delta\text{U}2\text{SGlcNS}/\Delta\text{UGlcNS}6\text{S}$; 2 - $\Delta\text{U}2\text{SGlcNS}6\text{S}$; 3. $\Delta\text{U},2\text{S-GlcNS},6\text{S-GlcUA-GlcNS},6\text{S}$. (B). Em presença de OSCS na mesma quantidade que a de heparina (100 μg), a reação não ocorre, não sendo observados produtos.

O efeito inibitório da ligação de OSCS à heparinase foi testado por dois métodos, cinético e fluorimétrico. No método cinético, a atividade da heparinase recombinante sobre heparina foi determinada em diferentes concentrações de OSCS, na presença de 1085 μM de heparina, 10mM Ca^{2+} , em 50 mM de HEPES, pH 7,0, a 30°C. A Figura 48A mostra a diminuição da formação de produtos de heparina pela heparinase na presença inibitória de OSCS em várias concentrações. A Figura 48B apresenta a taxa de atividade remanescente de heparinase em função da concentração de OSCS. Esses dados forneceram um valor de K_i de 0,65 μM , calculado com ajuda do programa GraFit V. 5.0 (Erithacus Software Ltd).

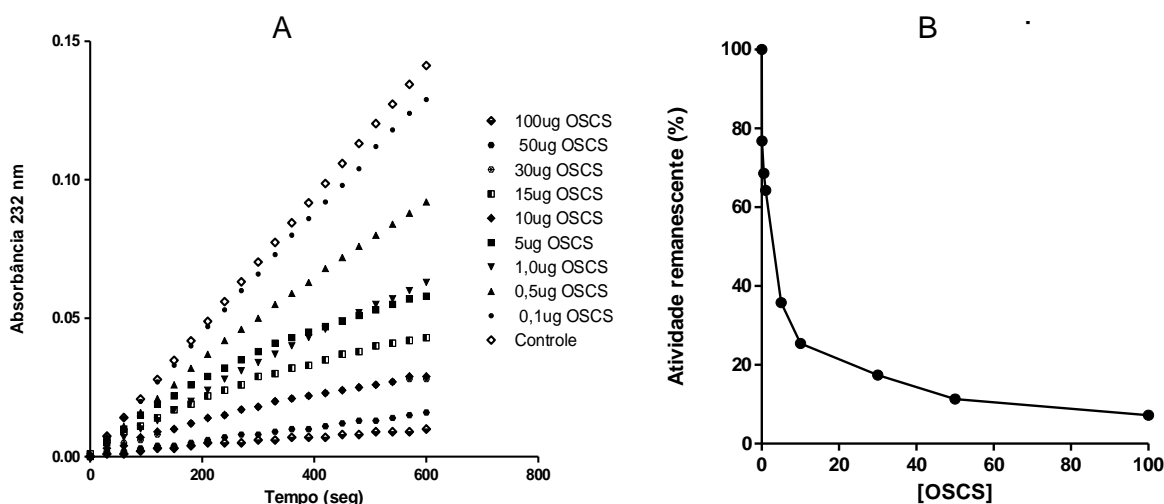


Figura 48. Efeito inibitório de OSCS sobre atividade da heparinase.

A atividade da heparinase sobre heparina foi determinada em diferentes concentrações de OSCS, na presença de 1085 µM de heparina, 10 mM Ca^{2+} , em 50 mM de HEPES, pH 7,0, a 30°C. **A.** Diminuição da velocidade de formação de produtos de heparina pela heparinase sob ação inibitória de OSCS concentração-dependente. **B.** Atividade remanescente (%) de heparinase em função da concentração de OSCS. Os dados forneceram o valor de $K_i = 0,65 \mu\text{M}$.

A Figura 48 demonstra claramente a inibição da atividade da heparinase por OSCS, de forma dose-dependente. A similaridade estrutural e físico-química dos dois compostos pode explicar a influência do OSCS sobre heparinase. OSCS consiste na super sulfatação do condroitim sulfato 4 sulfato, apresentando unidades dissacarídicas com 4 grupos sulfato e 18 kDa; já heparina apresenta 2 a 3 grupos sulfato por unidade dissacarídica, com tamanho de 12 a 15 kDa (Li et al, 2009; Lühn, Schiemann & Alban, 2011).

Heparinase de *F. heparinum* contém 6 resíduos de tirosina (Figura 29), sendo que um deles, localizado na posição 150, está dentro do sítio da sequência de aminoácido que alinha perfeitamente com o sítio ativo de heparinase de *B. thetaiotaomicron*, próximo a agrupamentos de resíduos básicos envolvidos na ligação do substrato e na catálise. Assim, a emissão de fluorescência desses resíduos de triptofano pode ser usada para o estudo de mudanças locais de conformação da enzima, induzidas pela ligação da heparina ou análogos da heparina.

A fluorescência intrínseca do triptofano foi monitorada pela emissão em 350 nm (fenda de 5 nm) após excitação no comprimento de onda de 285 nm. A adição de diferentes concentrações de heparina ou OSCS (0.01 – 5 ug/mL) resultou em perda da fluorescência do triptofano de maneira concentração-dependente, indicando que ambos os compostos interagem com a proteína de um modo similar, com K_{Ds} (constante de dissociação do substrato) comparáveis (0,97 μ M para heparina e 0,52 μ M para OSCS) (Figura 49). Dois métodos diferentes para análise do efeito inibitório geraram valores similares das constante de dissociação ($K_D = 0,52 \mu$ M) e de inibição ($K_i = 0,65 \mu$ M) do OSCS em relação à heparinase, validando tais resultados.

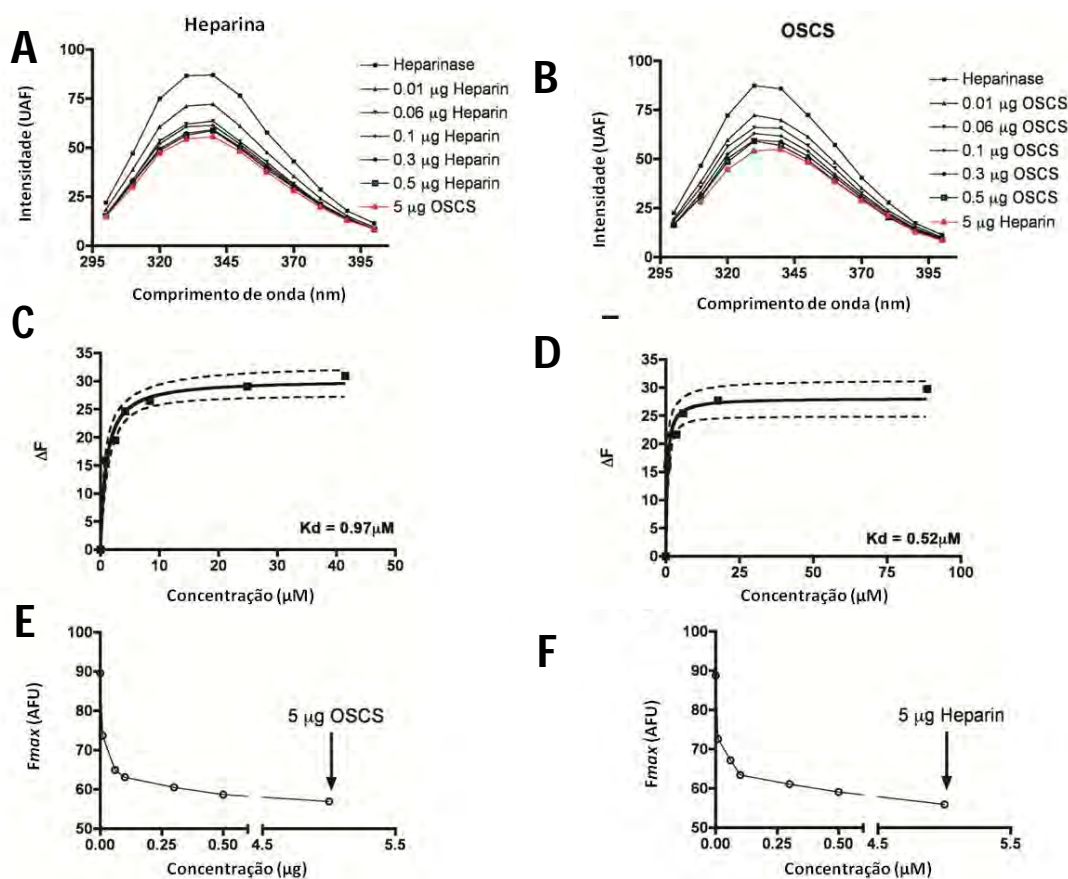


Figura 49. Ensaio de ligação de heparina e OSCS em heparinase.

A e B. Varredura da fluorescência intrínseca da heparinase (30 ng/mL) individualmente ou associada na presença de diferentes concentrações de heparina ou OSCS (0.01 – 5 ug/mL). **C e D.** Determinação do K_D a partir dos valores da variação de fluorescência obtidos pela varredura em função da concentração de heparina ou OSCS. **E e F.** Diminuição da

fluorescência máxima em função do aumento na concentração de heparina ou condroitim sulfato supersulfatado.

Para testar se heparina é capaz de deslocar o inibidor, o experimento foi realizado de maneira inversa, primeiro pré-incubando heparinase com OSCS e depois adicionando heparina. A Figura 50 mostra que a heparinase não retoma sua atividade mesmo com adição de excesso de heparina. OSCS inativa completamente a enzima, uma vez adicionado antes da heparina nas concentrações utilizadas no experimento, comprovando sua maior afinidade.

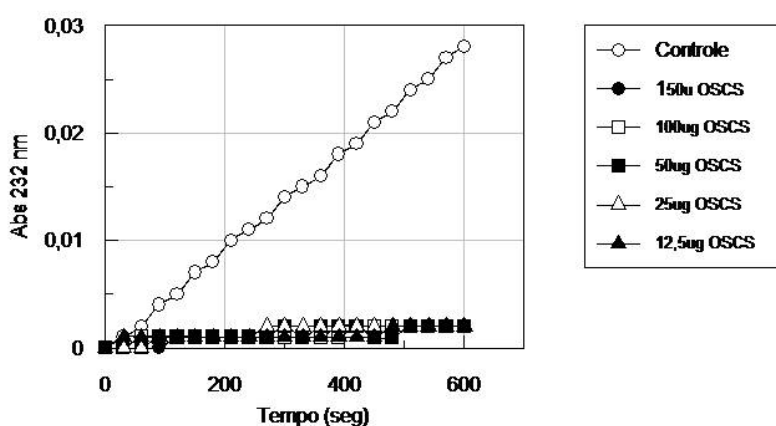


Figura 50. Ensaio de deslocamento de OSCS da heparinase por heparina.

Heparinase foi pré-incubada com OSCS em diferentes concentrações e em seguida foi adicionada 1085µM e heparina em presença de 10mM Ca^{2+} , em 50 mM de HEPES, pH 7,0, a 30°C. Mesmo em excesso em relação ao OSCS, heparina não conseguiu deslocar o inibidor.

OSCS vem atraindo atenção da comunidade científica e da indústria farmacêutica por ser responsável por uma grave crise de contaminação de lotes de heparina, causa pela qual muitos pacientes foram a óbito por distúrbios na coagulação e reações alérgicas graves. O estudo do comportamento deste composto diante das ferramentas utilizadas para a pesquisa de heparina, como heparinase, pode ajudar a entender melhor os mecanismos pelos quais OSCS age no organismo e desenvolver técnicas de depuração deste no sangue periférico. Diante dos resultados apresentados podemos concluir que OSCS apresenta maior afinidade pela heparinase quando comparado com heparina e sua ligação ao sítio ativo da enzima não pode ser revertido por este substrato. O alto nível de sulfatação e a similaridade estrutural do ácido glucurônico 2,3-

dissulfatado do OSCS com o ácido idurônico 2-sulfatado da heparina podem explicar a forte afinidade estrutural do OSCS pela heparinase. Esta nova característica do OSCS em inibir heparinase, ainda não descrita, fornece, além de novos dados sobre o comportamento do OSCS, um importante inibidor para o estudo da catálise da heparinase.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

1. Pela combinação de resinas de troca iônica e gel filtração foi possível purificar em larga escala de *Flavobacterium heparinum* induzida por heparina, as liases: heparinase, condroitinase AC e duas heparitinases funcionalmente ativas, como descrito por Nader et al. (1990).
2. Empregando *primers* específicos para as enzimas heparinase e heparitinase I e utilizando como molde o DNA genômico de *Flavobacterium heparinum*, foram amplificados e clonados em vetor de expressão os segmentos de DNA que codificam para as duas enzimas supracitadas (1118 e 1980 pb, respectivamente);
3. O seqüenciamento dos segmentos de DNA mostrou 100% de identidade de heparinase e heparitinase I recombinantes com as enzimas clonadas por Sasisekharan et al. (1993) e Godavarti et al. (1996) na literatura, respectivamente;
4. O rendimento da expressão da heparinase (10%) e da heparitinase I (1-2%) é baixo quando comparado com a purificação das enzimas induzidas na *F. heparinum*;
5. Os mesmos produtos de degradação da heparina e do heparam sulfato foram observados tanto para as enzimas nativas como para as recombinantes;
6. Com relação à Heparinase
 - O estudo do efeito de íons cálcio na catálise da heparinase revelou que este cátion é um ativador essencial para a enzima, sendo que a adição de EDTA não afeta a heparinase, mas, por ser um quelante de Ca^{2+} , remove-o do sistema enzimático, levando à velocidade zero;
 - Os dados mostram que íon cálcio livre não age sobre a enzima, e sim sobre o substrato, fazendo com que o complexo heparina-cálcio seja o verdadeiro substrato da enzima heparinase;

- Estudo da especificidade da heparinase sobre heparina mostraram que o grupo 2-O-sulfato do ácido idurônico da heparina é essencial para catálise da heparinase, como descrito por Nader et al. (1999b), e a N-dessulfatação seguida de N-acetilação da heparina (HepNAc) extinguiu totalmente a capacidade de ligação à enzima, provavelmente por induzir mudança de conformação na glucosamina. Além disso, a eliminação permanente da carga negativa do grupo carboxila do anel uronato de heparina não impede sua ligação ao sítio ativo da enzima, mas afeta sua catálise;
- A enzima sofre rápida desnaturação a temperaturas acima de 35°C, refletida no maior valor da energia desnaturação em relação à energia de ativação ($Ea_{cat} = 13 \pm 1$ kcal/mol; $Ea_{denat} = 88 \pm 5$ kcal/mol);
- Foi observado que dois grupos prototrópicos ionizam no sítio ativo da heparinase a 30°C. Os valores de pK_a foram determinados para a enzima livre ($pK_{E1} = 5.48 \pm 0.05$ e $pK_{E2} = 7.85 \pm 0.05$) e complexada com o substrato ($pK_{ES1} = 5.45 \pm 0.05$ e $pK_{ES2} = 8.82 \pm 0.03$), pela medida pH-dependente de k_{cat}/K_S , k_{cat} and K_S ;
- Os dados dos valores de pK_a , das propriedades termodinâmicas e do estudo da perturbação por solventes orgânicos mostraram que o grupo ionizável responsável pelo valor de $pK_{E1} = 5.48 \pm 0.05$ é um grupo catiônico, provavelmente uma histidina cataliticamente ativa com $\Delta H_{ion} = 7.3 \pm 0.2$ kcal/mol e $\Delta S_{ion} = -0.7 \pm 0.3$ cal/mol.K. Os valores de $pK_{E2} = 7.85$, $\Delta H_{ion} = 6.8 \pm 0.4$ kcal/mol, $\Delta S_{ion} = -13 \pm 1$ cal/mol.K não são conclusivos, sugerindo a presença de um resíduo de tirosina ou de histidina. A ligação da heparina à heparinase induziu um grande aumento de pK_{E2} de 7.85 para 8.82 e a entropia de ionização de -13 to -18 cal/mol.K sem mudança de entalpia de ionização, indicando a ionização de um ácido neutro como mostrado por um grupo fenol de um resíduo de tirosina;
- Os dados demonstraram que a heparinase só é cataliticamente ativa em pH neutro;

- Efeito de perturbação por isótopo na catálise da heparinase mostrou que o passo limitante da enzima é o envolvimento de apenas um próton no mecanismo de ação ($n=1.0$), o qual pode ser doado para o "leaving group" da GlnS,6S da ligação glicosídica durante o processo de β -eliminação por um resíduo ácido do sítio catalítico da heparinase, como por exemplo uma tirosina;
- Estudos mutagênicos mostraram que os resíduos H165 e Q163 não são essenciais para catálise da heparinase de *F. heparinum*, corroborando com os resultados descritos por Godavarti et al. (1996), mas indo contra os dados da heparinase de *B. thetaiotaomicron* descrita por Han et al. (2009). Cinética da enzima selvagem e suas mutantes a diferentes pHs mostraram que as mutações não afetaram o perfil de catálise da enzima, sugerindo que o comportamento dos grupos prototrópicos do sítio ativo não foi alterado;
- Diante dos resultados cinéticos, o presente trabalho propõe o envolvimento na catálise da heparinase sobre heparina de dois resíduos essenciais: histidina e tirosina (Figura 50). No sítio ativo de heparinase a pH 7,0, o anel imidazólico de um resíduo de histidina está desprotonado e um grupo fenol está protonado. Assim, o grupo fenol protonado ($pK_{E2} = 7.85$) pode ajudar no mecanismo catalítico como um doador de próton. Por outro lado, o meio positivamente carregado do sítio ativo da heparinase determinado pela proximidade de aminoácidos básicos (Sasisekharan et al., 1996; Godavarti et al., 1996) pode aumentar o caráter básico do anel imidazólico aumentando a reatividade da histidina ($pK_{E1} = 5.48$), a qual age como uma base para abstração do próton de C5.

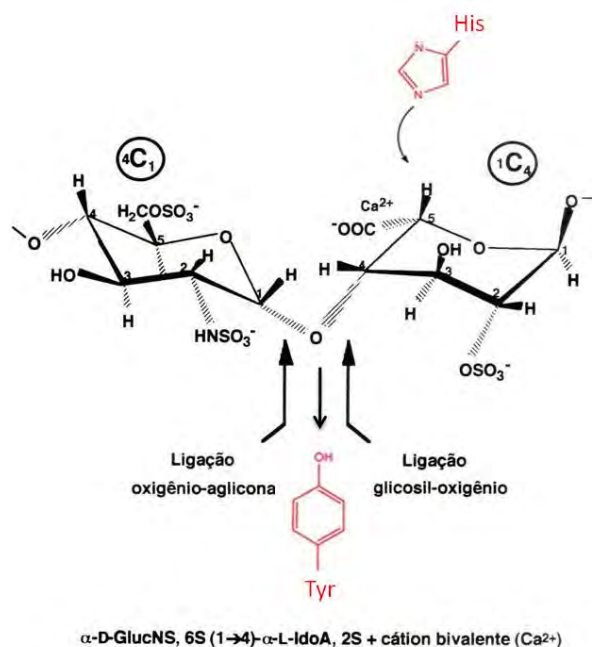


Figura 50: Sítio de clivagem da heparina pela heparinase e possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise.

7. Com relação ao efeito inibitório condroitim sulfato supersulfatado (OSCS) sobre heparinase

- Foi observada a presença de OSCS como contaminante em lotes de heparina comercial;
- Os resultados da cinética de inibição da heparinase revelaram que OSCS inibe sua atividade, competindo com heparina pela ligação ao sítio ativo da enzima, apresentando $K_i = 0,65 \mu\text{M}$;
- OSCS apresentou maior afinidade de ligação à heparinase ($K_D = 0,52 \mu\text{M}$) do que o próprio substrato da enzima, heparina ($K_D = 0,97 \mu\text{M}$), assim, uma vez ligado, OSCS não pode ser deslocado pela heparina;
- Pelos dados apresentados, OSCS é um potente inibidor competitivo da heparinase, ligando-se no mesmo sítio que heparina, porém com maior afinidade.

RESUMO

Características estruturais de heparina (Hep) e heparan sulfato (HS) têm sido determinadas usando enzima de *Flavobacterium heparinum*, uma bactéria de solo, não-patogênica. Sob indução com Hep/HS ou seus dissacarídeos como única fonte de carbono e nitrogênio, a bactéria sintetiza heparinase e heparitinases I e II. Essas liases clivam heparina e HS por um processo β -eliminativo em um padrão endolítico aleatório. Heparitinase I cliva exclusivamente ligações α -D-glucosamina N-acetilada ou N-sulfatada (1 \rightarrow 4) β -D-glucuronato de HS/Hep sem haver substituição de sulfato em C6; Heparitinase II cliva ligações α -D-glucosamina N-acetil-6-sulfato ou N-sulfato ou N,6-sulfato (1 \rightarrow 4) β -D-glucuronato ou α -L- iduronato de HS/Hep, sem haver substituição de sulfato em C3. Heparinase cliva uma α -D-glucosamina N- e 6-sulfato (1 \rightarrow 4) α -L- iduronato 2-sulfato, presente em heparina. Este trabalho objetiva clonar e expressar heparinase e heparitinase I e estudar o comportamento cinético da heparinase. As enzimas recombinantes foram expressas em *E. coli* usando o sistema de expressão pET T7 polimerase. O trabalho mostrou que o complexo heparina- Ca^{2+} -heparinase é o substrato verdadeiro para heparinase ($K_S = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$), enquanto que tanto a heparina livre de Ca^{2+} ($K_I = 12 \pm 2 \mu\text{M}$) como também um importante contaminante farmacêutico de heparina comercial, condroitim sulfato super sulfatado (OSCS) ($K_I = 0.65 \mu\text{M}$) são inibidores competitivos. Os valores de pK_a dos grupos prototrópicos do sítio ativo foram determinados pela medida pH-, solvente- e temperatura-dependente sobre as constantes k_{cat}/K_S , k_{cat} e K_S . Os resultados mostram, em $\text{pH}_{\text{ótimo}} = 6.67 \pm 0.05$, um resíduo de histidina desprotonada iniciando a reação de β -eliminação pela abstração do próton de C5 do resíduo α -L-iduronato 2-O-sulfato; e um resíduo de tirosina na forma protonada agindo como um doador de próton para o anel de hexosamina liberada. Mutações dos resíduos de histidina 165 e glutamina 163 foram realizadas e análises cinéticas mostraram a manutenção da atividade específica ($5,0 \times 10^{-7} \text{ Abs}/\mu\text{g.s}$), sugerindo que os resíduos H165 e Q163 não são essenciais para a atividade da heparinase.

ABSTRACT

Structural characteristics of heparin (Hep) and heparan sulfate (HS) have been determined using enzymes from *Flavobacterium heparinum*, a non-pathogenic soil bacterium. Upon induction with Hep/HS or their disaccharides as the sole source of carbon and nitrogen, the bacteria synthesize heparinase, and heparitinases I and II. This lyase cleaves heparin and HS by a β -eliminative process in a random endolytic pattern. Heparitinase I cleaves exclusively N-acetyl or N-sulfo-glucosaminide-glucuronic acid linkage of HS/Hep without C6 sulfate substitution; Heparitinase II cleaves N-acetyl-6-sulfo or N-sulfo or N,6-sulfo glucosaminide-glucuronic/ iduronic acid linkage of HS/Hep without C3 sulfate substitution. Heparinase cleaves an α -D-glucosamine N- and 6-sulfated (1 \rightarrow 4) α -L-iduronate 2-sulfated, present in heparin. This work aims to cloning and express heparinase and heparitinase I and study de kinetic behavior of heparinase. Recombinant enzymes were expressed in *E. coli* using the T7 polymerase pET expression system. The work shows that heparin-Ca²⁺-heparinase I complex is the true substrate for heparinase ($K_S = 1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$), whereas heparin Ca²⁺ free ($K_I = 12 \pm 2 \mu\text{M}$) as an important pharmaceutical contaminant of commercial heparin, oversulfate chondroitin sulfate (OSCS) ($K_i = 0.65 \mu\text{M}$) are competitive inhibitors. The pK_a values of the prototropic groups of the active site were determined by measuring the pH-, solvent- and temperature-dependence upon k_{cat}/K_{SA} , k_{cat} and K_{SA} constants. The results show, at $\text{pH}_{\text{optimum}} = 6.67 \pm 0.05$, a deprotonated histidine residue initiating the β -elimination reaction by the abstraction of the C5 proton of the α -L-iduronate 2-O-sulfate residue; and a tyrosin residue in a protonated form acting as a proton donor to the hexosamine leaving group. Mutations of histidine 165 and glutamine 163 residue were performed and kinetic analysis show specific activity maintenance ($5,0 \text{ e-}007 \text{ Abs}/\mu\text{g.s}$), suggesting that H165 and Q163 were not essential for the heparinase activity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, L. R. D. **Ocorrência de heparam sulfato sulfatases nos moluscos *Anomalocardia brasiliiana* e *Mesodesma donacium***. São Paulo, 1994. Dissertação de Mestrado, Convênio UFRN/EPM.
- Albersheim, P.; Neukom, H. & Devel, H. (1986) **Arch. Biochem. Biophys.**, **90**: 46-51.
- Allie, P. M.; Périn, J. P.; Maillet, P.; Bonnet, F. & Rosa, J. P. (1988) Complete amino acid sequence of a human platelet proteoglycan. **FEBS Lett** **236**: 123-126.
- Ando, T.; Yamasaki, M.; Suzuki, K. Protamine. In Kleinzeller, A.; Springer, G. F.; Wittnan, H. G. (1973) **Molecular, biochemistry and biophysics**. Springer-Verlag, Berlin.
- Aquino, R. S.; Lee, E. S. & Park, P. W. (2010) Diverse functions of glycosaminoglycans in infectious diseases. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.** **93**: 373-94.
- Arvatz, G.; Shafat, I.; Levy-Adam, F.; Ilan N. & Vlodansky, I. (2011) The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? **Cancer Metastasis Rev.** **30**:253-268
- Atkins, E. D. T. & Nieduszynski, I. A. (1977). **Fed. Proc.** **36**:78-83
- Baker, J. R.; Cifonelli, J. A. & Róden, L. (1975) The linkage of corneal keratan sulfate to protein. **Connect. Tis. Res.** **3**: 149-156.
- Bambino-Medeiros, R.; Oliveira, F. O.; Calvet, C. M.; Vicente, D.; Toma, L.; Krieger, M. A.; Meirelles, M. N. & Pereira, M. C. (2011) Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. **Parasitology** **27**: 1-9.
- Bame, K.J.; Venkatesan, I.; Stelling, H. D. & Tumova, S. (2000) The spacing of S-domains on HS glycosaminoglycans determines whether the chain is a substrate for intracellular heparanases. **Glycobiol.** **10**: 715-726.
- Beauvais, D. M. & Rapraeger, A. C. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. **Reproductive Biology and Endocrinology** **2**: 1-12.
- Best, C. H. (1959) Preparation of heparin and its use in the first clinical cases. **Circulation** **19**: 79-86.

- Bhavanandan, V. P. & Davidson, E. A. (1975) Mucopolysaccharides associated with nuclei of cultured mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**: 2032.
- Bianchini, P.; Osima, B.; Parma, B.; Dietrich, C. P.; Takahashi, H. K. & Nader, H. B. (1985) Structural studies and “in vivo” and “in vitro” pharmacological activities of heparin fractions and fragments prepared by chemical and enzymatic depolymerization. **Thromb. Res.** **40**: 49-58.
- Bienkowski, M. J. and Conrad, H. E. (1985). Structural characterization of the oligosaccharides formed by depolymerization of heparin with nitrous acid. **J. Biol. Chem.** **260**, 356-365.
- Bishop, J. R., Stanford, K. I., Esko, J. D. (2008) Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol.** **19(3)**:307-13.
- Blochberger, T. C.; Vergnes, J.; Hempel, J. & Hassell, J. R. (1992) cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. **J. Biol. Chem.** **267**: 347-352.
- Blossom, D. B.; Kallen, A. J.; Patel, P. R.; Elward, A.; Robinson, L.; Gao, G.; Langer, R.; Perkins, K. M.; Jaeger, J. L.; Kurkjian, K. M.; Jones, M.; Schillie, S. F.; Shehab, N.; Ketterer, D.; Venkataraman, G.; Kishimoto, T. K.; Shriver, Z.; McMahon, A. W.; Austen, F.; Kozlowski, S.; Srinivasan, A.; Turabelidze, G.; Gould, C. V.; Arduino, M. J.; & Sasisekharan, R. (2008) Outbreak of Adverse Reactions Associated with Contaminated Heparin. **N Engl J Med**, **359**:2674-84.
- Bouças, R. I.; Sampaio, L. O.; Andrade, G. P. V.; Lopes, C. C.; Nascimento, F. D.; Tersariol, I. L. S.; Rocha, A. O. & Nader, H. B. (2006) **Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis**. Carbohydrate Structure and Biological Function. Chapter 2, p.142-59.
- Bourin, M. C. & Lindahl, U. (1993) Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochem. J.** **289**: 313-330.
- Bray, B. A.; Leeberman, R. & Meyer, K. (1967) Structure of human skeletal keratosulfate. The linkage region. **J. Biol. Chem.** **242**: 4352-4359.
- Brimacombe, J. S. & Weber, J. M. (1964) **Mucopolysaccharides. Chemical structure, distribution and isolation**. B.B.A. Library, Elsevier Publishing Company, New York, p. 1-181.

- Brown, G. M.; Huckerby, T. N.; Nieduszynski, I. A. (1994) Oligosaccharides derived by keratanase II digestion of bovine articular cartilage keratin sulphates. **Eur. J. Biochem.** **224**:281-308.
- Brummel, K. E.; Butenas, S. & Mann, K. G. (1999) An integrated study of fibrinogen during blood coagulation. **J. Biol. Chem.** **274**: 22862.
- Burson, S. L.; Fahrenbach, M. J.; Frommhagen, L. H.; Riccardi, B. A.; Brown, R. A.; Brockman, J. A.; Lowry, H. V. & Stokstad, E. L. R. (1956) **J. Am. Chem. Soc.** **78**: 5874-78.
- Butenas, S.; van't Veer, C & Mann, K. G. (1997) Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. **J. Biol. Chem.** **272**: 21527.
- Carney, S. L. & Muir, H. (1988) The structure and function of cartilage proteoglycans. **Physiol. Reviews** **68**: 858-910.
- Cássaro, C.M.P. & Dietrich, C.P. (1977) The distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.** **252**: 2254-2261.
- Cavalcanti, C. M.; Allodi, S.; Valente, A. P., Straus, A. H. Takahashi, H. K.; Mourão, P. A. & Pavão, M. S. (2000). Occurrence of heparin in the invertebrate *styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. An ancient role in defense? **J. Biol. Chem.**, **275**: 36189- 36196.
- Chargaff, E. & Olson, K. B. (1937) Studies on the chemistry of blood coagulation. **J. Biol. Chem.** **38**: 122-153.
- Chavante, S. F.; Santos, E. A.; Oliveira, F. W.; Guerrini, M.; Torri, G.; Casu, B.; Dietrich, C. P. & Nader, H. B. (2000) A novel heparan sulfate with high degree of N-sulfation and high heparin cofactor II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Int. J. Biol. Macromol.** **27**: 49-57.
- Chen, T. I. & Tsai, C. (1948) The mechanism of haemostasis in peripheral vessels. **J. Physiol.** **107**: 280-288.
- Cifonelli, J. A. & Dorfman, A. (1960) Properties of heparin monosulfate (heparitin sulfate). **J. Biol. Chem.** **235**: 3283-3286.
- Cifonelli, J. A. and Dorfman, A. (1962) The uronic acid of heparin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **7**, 41-45.

- Cohen, M. (2000) The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thromb. Res.** **100**: 131-9.
- Cohen, M.; Maritz, F.; Gensini, G. F.; Danchin, N.; Timerman, A.; Huber, K.; Gurfinkel, E. P.; White, H.; Fox, K. A.; Vittori, L.; Le-Louer, V. & Bigonzi, F (2000) The TETAMI trial: the safety and efficacy of subcutaneous enoxaparin versus intravenous unfractionated heparin and of tirofiban versus placebo in the treatment of acute myocardial infarction for patients not thrombolized: methods and design. **J. Thromb. Thrombolysis.** **10**: 241-6.
- Collignon, F.; Frydman, A.; Caplain, H.; Ozoux, M.; Le Roux, Y.; Bouthier, J & Thebault, J. J. (1995) Comparison of the pharmacokinetic profiles of three low molecular mass heparins-dalteparin, enoxaparin and nadroparin-administered subcutaneously in healthy volunteers (doses for prevention of thromboembolism). **Thromb. Haemost.** **73**: 630-40.
- Cooper, G. M. & Hausman, R. E. Glicosilação de proteínas dentro do Golgi. In: **A Célula: uma abordagem molecular**. 3th ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 9, p.372-4.
- Córdula, C. R. **Estudo de indução das Endoglicosidases de Flavobacterium heparinum. Clonagem da Heparinase III**. São Paulo, 2006. 90p. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo.
- Crafoord, C. (1939) Heparin and post-operative thrombosis. **Acta Chirurgica Scandinavica** **82**: 319.
- Cruz, W. O. & Dietrich, C. P. (1967) Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **126**: 420-6.
- Danishefsky, I.; Steiner, H., Bella, Jr. A. and Friedlander, A. (1969). Investigations on the chemistry of heparin. VI. Position of the sulfate ester groups. **J.Biol. Chem.** **244**: 1741-1745.
- Davie, E. W. (2003) A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **J. Biol. Chem.** **278**: 50819.
- DeAngelis, P. L. & Padgett-McCue, A. J. (2000) Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. **J. Biol. Chem.** **275**: 24124-24129.

- DeAngelis, P. L. (2002) Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: Implications of the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. **Anat. Rec.** **268**: 317-326.
- Desai, U. R.; Wang, H. & Linhardt, R. J. (1993) Substrate specificity of the heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. **Arch. Biochem. Biophys.** **306**: 461-468.
- Dickenson, J. M.; Huckerby, T. N.; Nieduszynski, I. A. (1990) Two linkage-region fragments isolated from skeletal keratan sulphate contain a sulphated N-acetylglucosamine residue. **Biochem J.** **269(1)**:55-9.
- Dietrich, C. P. (1968) Novel heparin degradation products. Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation. **Biochem. J.** **108**: 647-654.
- Dietrich, C. P. (1969a) Enzymic degradation of heparin. A sulphamidase and a sulfoesterase from *Flavobacterium heparinum*. **Biochem. J.** **111**: 91-95.
- Dietrich, C. P. (1969b) Enzymic degradation of heparin. A glycosaminidase and glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*. **Biochemistry** **8**: 2089-2094.
- Dietrich, C. P. (1969c) Studies on the induction of heparin degrading enzymes in *Flavobacterium heparinum*. **Biochemistry** **8**: 3342-3347.
- Dietrich, C. P. & Montes de Oca, H. (1970) Production of heparin-related mucopolysaccharides by mammalian cells in culture. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **134**: 955-962.
- Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; Britto, L. R. G. & Silva, M. E. (1971) Chemical composition of heparitin sulfate. Fractionation and characterization of four acidic mucopolysaccharides in heparitin sulfate from beef lung tissue. **Biochim. Biophys. Acta** **237**: 430-441.
- Dietrich, C. P.; Silva, M. E. & Michelacci, Y. M. (1973) Sequential degradation of heparin in *Flavobacterium heparinum*. Purification and properties of 5 enzymes involved in heparin degradation. **J. Biol. Chem.** **248**: 6409-6415.
- Dietrich, C. P. & Nader, H. B. (1974) Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissues. Isolation and characterization of a homogenous species of heparitin sulfate. **Biochim. Biophys. Acta** **343**: 34-44.

- Dietrich, C. P. Nader, H. B. & McDuffie, M. (1975) Eletrofocusing of heparin. Presence of monomeric and dimeric molecular species in heparin preparations. **An. Acad. Brasil. Ciênc.** **47**: 301-8.
- Dietrich, C. P. & Dietrich, S. M. C. (1976) Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.** **70**: 645-647.
- Dietrich, C. P.; Sampaio, L. O. & Toledo, O. M. S. (1976) Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **71**: 1-10.
- Dietrich, C. P.; Sampaio, L. O.; Toledo, O. M. S. & Cássaro, C. M. F. (1977) Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **75**:329-36
- Dietrich, C. P. & Armelin, H. A. (1978) Sulfated mucopolysaccharides from normal swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant STI: Possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **84**: 794-801.
- Dietrich, C. P. & Montes de Oca, H. (1978) Surface sulfated mucopolysaccharides of primary and permanent mammalian cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **80**: 805-812.
- Dietrich, C. P.; Schibuola, C. P.; Sampaio, L. O. & Ibara, I. (1978) Changes in the composition of mucopolysaccharides during neoplastic transformation of cerebral tissue. **Cancer Res.** **38**: 3969-3971.
- Dietrich, C. P.; Sampaio, L. O.; Montes de Oca, H. & Nader, H. B. (1980). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An. Acad. Bras. Cienc.** **52**, 179-186.
- Dietrich, C. P.; Michelacci, Y. M. & Nader, H. B. (1980) **Mucopolysaccharidases from *Flavobacterium heparinum*. Isolation, characterization and use for structural analysis of chondroitin sulfates, heparin and heparitin sulfates.** In: Marshal, J.J. (Ed) **Mechanism of saccharide polymerization / depolymerization.** Academic Press, New York, 317-329.
- Dietrich, C. P.; Nader, H. B. & Straus, A. H. (1983) Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **111**: 865-871.

- Dietrich, C. P.; Paiva, V. M. P.; Jerônimo, S. M. B.; Ferreira, T. M. P. C.; Medeiros, M. G. L.; Paiva, J. F. & Nader, H. B. (1983) Characteristic distribution of heparan sulfates and chondroitin sulfates in tissues and organs of the ampularidae *Pomacea* sp. Comp. **Biochem. Physiol.** **76 B**: 695-698.
- Dietrich, C. P. (1984) A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **17**: 5-15.
- Dietrich, C. P.; Paiva, J. F.; Moraes, C. T.; Takahashi, H. K.; Porcionatto, M. A. & Nader, H. B. (1985) Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta** **843**: 1-7.
- Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; Paiva, J. F.; Tersariol, I. L. S.; Santos, E. A.; Holme, K. R. & Perlin, A. S. (1989) Heparin in mollusks: chemical, enzymatic degradation and ¹³C and ¹H n.m.r. spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. **Int. J. Biol. Macromol.** **11**: 361-6.
- Dietrich, C. P.; Tersariol, I. L. S.; Toma, L.; Moraes, C. T.; Porcionatto, M. A.; Oliveira, F. W. & Nader, H. B. (1998) Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparin sulfate of different origins. **Cellular and Molecular Biology.** **44**: 417-29.
- Dietrich, C. P.; Paiva, J. F.; Castro, R. A. B.; Chavante, S. F.; Jeske, W. Farred, J.; Gorin, P. A.; Mendes, A. & Nader, H. B. (1999a) Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochem. Biophys. Acta** **1428**: 273-83.
- Dietrich, C. P.; Shinjo, S. K.; Moraes, F. A.; Castro, R. A. B.; Mendes, A.; Gouvea, T. C. & Nader, H. B. (1999b) Structural features and bleeding activity of commercial low molecular weight heparins: neutralization by ATP and protamine. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis.** **25**: 43-5.
- Donato, J. L.; Nogueira, M. D.; Mcondes, S.; Antunes, E.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. & Nucci, G. (1994) The kinetics of chondroitin 4-sulfate release from stimulated platelets and its relation to thromboxane A₂ formation and granule secretion. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **27**: 2163-2167.
- Dreyfuss, J. L.; Regatieri C. V.; Jarrouge, T. R.; Cavalheiro, R. P.; Sampaio, L. O. & Nader HB. (2009) Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An Acad Bras Cienc.** **81(3)**:409-29.

- hr/>
- Ehrlich, J. & Stivala, S. S. (1973) Chemistry and pharmacology of heparin. **J. Pharmacol. Sci.** **62**: 517.
- Enyedy, E. J., and Kovach, I. M. (2004) Proton inventory studies of alpha-thrombin-catalyzed reactions of substrates with selected P and P' sites. **J. Am. Chem. Soc.** **126**: 6017–6024.
- Fareed, J.; Walenga, M.; Hoppensateadt, D.; Huan, S. & Nonn, R. (1989) Biochemical and pharmacologic inequivalence of low molecular weight heparins. Heparin and related polysaccharides. **Ann N. Y. Acad. Sci.** **556**: 333-53.
- Fedarko, N. S. & Conrad, H. E. (1986) A unique heparan sulfate in the nucleio f hepatocytes: Structural changes with the growth state of the cells. **Journal of Cell Biology** **102**: 587-599.
- Ferraira, T. M. P. C.; Medeiros, M. G. L.; Dietrich, C. P. & Nader, H. B. (1993) Structure of heparan sulfate from the fresh water mollusc *Anomantidae sp*: sequencing of its disaccharide units. **Int. Biochem.** **24**: 1219-25.
- Findlay, D., Mathias, A. P., & Rabin, B. R. (1962) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 4. The activity in inert organic solvents and alcohols. **Biochem. J.** **85**: 134-139.
- Foster, A. B., Harrison, R., Inch, T. D., Stacey, M. and Webber, J. M. (1963). Amino sugars and related compounds. Part IX. Periodate oxidation of heparin and some related substances. **Journal of the Chemical Society** **1963**: 2279-2287.
- Fransson, L. Å. (1968a) Structure of dermatan sulfate III. The hybrid structure of dermatan sulfate from umbilical cord. **J. Biol. Chem.** **243**: 1504-1510.
- Fransson, L. Å. (1968b) Structure of dermatan sulfate. IV. Glycopeptide from the carbohydrate-protein linkage region of pig skin dermatan sulfate. **Biochim. Biophys. Acta** **156**: 311-316.
- Fransson, L. A.; Havsmark, B. (1970) Structure of dermatan sulfate. VII. The copolymeric structure of dermatan sulfate from horse aorta. **J. Biol. Chem.** **245(18)**:4770-4783.
- Fransson, L. Å. & Malmström, A. (1971) Structure of pig skin dermatan sulfate I. Distribution of D-glucuronic acid residues. **Eur. J. Biochem.** **18**: 422-430.
- Fransson, L. Å. (1985) **Mammalian glycosaminoglycans. The polysaccharides.** Aspinall, G.O. (Ed), vol. 3, New York, Academic Press.

- Fransson, L.A.; Silverberg, I & Carlsted, I. (1985) Structure of heparan sulfate protein linkage region: demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. **J. Biol. Chem.** **260**: 14722-14726.
- Fraser, J. R. E.; Laurent, T. C and Laurent, U. B. G. (1997) Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J. Intern. Med.** **242**: 27-33.
- Godavarti, R. & Sasisekharan, R. (1996) A comparison of the primary sequences and characteristics of heparinases I, II and III from *Flavobacterium heparinum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **229**: 770-777.
- Godavarti, R.; Davis, M.; Venkataraman, G.; Cooney, C.; Langer, R. & Sasisekharan, R. (1996) Heparinase III from *Flavobacterium heparinum*: cloning and recombinant expression in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **225**: 751-758.
- Godavarti, R., Cooney, C.L., Langer, R., and Sasisekharan, R. (1996) Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. Identification of a critical histidine residue essential for catalysis as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. **Biochemistry** **28**: 6846-6852
- Godavarti, R. & Sasisekharan, R. (1998) Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. Role of positive charge in enzymatic activity. **J Biol Chem.** **273**: 248-255.
- Gomes, P. B. & Dietrich, C. P. (1982) Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.** **73**: 857-63.
- Grace, S., and Dunaway-Mariano, D. (1983) Examination of the solvent perturbation technique as a method to identify enzyme catalytic groups. **Biochemistry** **22**: 4238-4247.
- Han, Y; Garron, M.; Kim, H.;Kim, W.; Zhang, Z.; Ryu, K.; Shaya, D.; Xiao, Z.; Cheong, C.; Kim, Y.S.; Linhardt, R.; Jeon, Y. H. & Cygler, M. Structural snapshots of heparin depolymerization by heparin lyase I. **J. Biol Chem.** **284**: 34019-34027, 2009.
- Hardingham, T. E.; Fosang, A. J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB J.** **6(3)**:861-70.
- Hardingham, T. E.; Fosang, A. J.; Dudhia, J. (1994) The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage. **Eur J Clin Chem Clin Biochem.** **32(4)**:249-57.

- Harvey, D. M. & Offord, R. H. (2000) Management of venous and cardiovascular thrombosis: enoxaparin. **Hosp. Med.** **61**: 628-36.
- Hayashi, M.; Kadomatsu, K & Ishiguro, N (2010) Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis model. **Biochem Biophys. Res. Commun.** **401(3)**: 463-8.
- Hayashi, Y.; Call, M. K.; Chikama, T.; Liu, H.; Carlson, E. C.; Sun, Y.; Pearlman, E.; Funderburgh, J. L.; Babcock, G.; Liu, C. Y.; Ohashi, Y. & Kao, W. W. (2010) Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. **J. Cell Sci.** **123 (17)**: 2987-95.
- Hirsh, J. & Levine, M. N. (1992) Low molecular weight heparin. **Blood.** **79**: 1-2.
- Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Shaughnessy, S. G.; Anand, S. S.; Halperin, J. L.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E. M. & Dalen, J. E. (2001) Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficiency and safety. **Chest.** **119**: 64-94.
- Hoffman, P.; Linker, A.; Sampson, P.; Meyer, K. & Korn, E. D. (1957) The degradation of hyaluronate, the chondroitin sulfates and heparin by bacterial enzymes (*flavobacterium*). **Biochim. Biophys. Acta** **25**: 658-659.
- Holmgren, H. & Wilander, O. (1937) Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Erlichschen Mastzellen. **Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung** **42**: 242.
- Höök, M.; Lindahl, U. & Iverius, P. H. (1974) Distribution of sulphate and iduronic acid residues in heparin and heparan sulfate. **Biochem. J.** **137**: 33-34.
- Howell, W. H. (1925) The purification of heparin and its presence in blood. **American Journal of Physiology** **71**: 553-562.
- Howell, W. H. (1928) The purification of heparin and its chemical and physiological reactions. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital** **42**: 199-206.
- Hullet, M. D.; Freeman, C.; Handorf, B. J.; Baker, R. T.; Harris, M. J. & Parish, C. R. (1999) Cloning of mammalian heparanase, a important enzyme in tumor invasion and metastasis. **Nat. Med.** **5**: 803-809.
- Inoue, H; Hojima, H; & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. **Gene.** **96**: 23-28.

- lozzo, R.V. (1987) Turnover of heparin sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. **J. Biol. Chem.** **262**: 1888-1900.
- Irimura, T.; Nakajima, M. & Nicolson, G. L. (1986) Chemically modified heparins as inhibitors of heparin sulfate specific endo-beta-glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells. **Biochemistry** **25**: 5322-5328.
- Jansson, L. & Lindahl, U. (1970) Evidence for the existence of a multichain proteoglycan of heparin sulfate. **Biochem J.** **117**:699-702.
- Jansson, L.; Ögren, S. & Lindhal. U (1975) Macromolecular properties and end-group analysis of heparin isolated from bovine liver capsule. **Biochem. J.** **145**:53-62.
- Jaseja, M.; Rej, R. N.; Sauriol, F. & Perlin, A. (1989) Novel region and stereoselective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence. **Can. J. Chem.** **67**: 1449-1456.
- Jaques, L. B.; Ballieux, R. E.; Dietrich, C. P. & Kavanagh, L. W. (1968) A microelectrophoresis method for heparin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **46**: 351-360.
- Jorpes, E. (1935). The chemistry of heparin. **Biochem. J.** **29**: 1817-1830.
- Jorpes, E. and Bergström, S. (1936). Der Aminosucker des Heparins. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie** **244**, 253.
- Jorpes, E.; Holmgren, H & Wilander, O. (1937) Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. Ein Beitrag zur Physiologie der Ehrlichschen Mastzellen. **Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung** **42**: 279.
- Jorpes, E. (1946). **Heparin in the treatment of thrombosis. An account of its chemistry, physiology, and application in medicine**, 2nd edition. Oxford University Press, London.
- Jorpes, J. E. & Gardell, S. (1948) On heparin monosulfuric acid. **J. Biol. Chem.** **176**: 267-273.
- Jorpes, E. Boström H. and Mutt, V. (1950) The linkage of the amino group in heparin. Alleged acetyl content of heparin. **J. Biol. Chem.** **183**: 607-615.
- Kanwar, Y. S., Farquhar, M. G. (1979) Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**: 1303-1307.

- Kasevayuth, K. & Yanagishita, M. (2004) Catabolism of heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* cell lines. **Biochem Biophys Res Commun.** **324**: 205-211.
- Kennedy, J. F. & White, C. A. (1983) **Bioactive Carbohydr.** Ellis. Horwood. Chichester U.K.
- Kiga, N.; Tojyo, I.; Matsumoto, T.; Hiraishi, Y.; Shinohara, Y. & Fujita, S. (2010) Expression of lumican in the articular disc of the human temporomandibular joint. **Eur. J. Histochem.** **54(3)**: e34.
- Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T.; Elankumaran, S.; Smith, Sean.; Pelzer, K.; Lansing, J. C.; Sriranganathan, N.; Zhao, G.; Galcheva-Gargova, Z.; Al-Hakim, A.; Bailey, G. S.; Fraser, B.; Roy, S.; Rogers-Cotrone, T.; Buhse, L.; Whary, M.; Fox, J.; Nasr, M.; Dal Pan, G. J., Shriver Z.; Langer, R. S.; Venkataraman, G., Austen, F. K., Woodcock, J. & Sasisekharan, R. (2008) Contaminated Heparin Associated with Adverse Clinical Events and Activation of the Contact System. **N Engl J Med** **358**:2457-67.
- Kobayashi, E. Y. **Métodos de purificação de glicosaminoglicanos liases de *Flavobacterium heparinum*. Especificidade das heparitinases.** São Paulo, 1996. 120p. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo.
- Kraemer, P. M. (1971a) Heparan sulfates of cultured cells. I. Membrane-associated and cell-sap species in Chinese hamster cells. **Biochemistry** **10**: 1437.
- Kraemer, P. M. (1971b) Heparan sulfates of cultured cells II. Acid-soluble and -precipitable species of different cell lines. **Biochemistry** **10**: 1445-1451.
- Kraemer, P. M. & Tobey, R. A. (1972) Cell-cycle dependent desquamation of heparan sulfates from cell surface. **J. Cell Biol.** **55**: 713-719.
- Kraemer, P. M. & Smith, D. A. (1974) High molecular-weight heparin sulfate from the cell surface. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **56**:423-30.
- Kresse, H. & Glossl, J. (1987) Glycosaminoglycan degradation. **ADV Enzymol.** **60**: 217-311.
- Kusche, M.; Bäckström, G.; Riesenfeld, J.; Petitou, M.; Choay, J. & Lindahl, U. (1988) Biosynthesis of heparin. O-sulfation of the antithrombin binding-region. **J. Biol. Chem.** **263**: 15474-15484.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T-4. **Nature** **227**: 680-688.
- Laurent, T. C. & Fraser, J. R. (1986) The properties and turnover of hyaluronan. **Ciba Found Symp.** **124**:9-29.
- Laurent, T. C and Laurent, U. B. G. & Fraser, J. R. E. (1996) Serum hyaluronan as a disease marker. **Ann Med** **28**: 242-53.
- Levy-Adam, F.; Miao, H. Q.; Henrikson, R. L.; Vlodavsky, I. & Ilan, N. (2003) Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **308**: 885-891
- Li, B.; Suwan, J.; Martin, J. G.; Zhang, F.; Zhang, Z.; Hoppensteadt, D.; Clark, M.; Fareed, J. and Linhardt, R. J. (2009) Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding proteins: New insights into adverse reactions from contaminated heparins. **Biochem. Pharm.** **78**: 292-300.
- Lim, S. T.; Longley, R. I. & Couchman, J. R. & Woods, A. (2003). Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C α (PKC α) increases focal adhesion localization of PKC α . **J. Biol. Chem.** **278**: 13795-13802.
- Lindahl, U. (1966b) Further characterization of the heparin-protein linkage region. **Biochimica et Biophysica Acta** **130**: 368-382.
- Lindahl, U. and Axelsson, O. (1971) Identification of iduronic acid as a major sulfated uronic acid of heparin. **J. Biol. Chem.** **246**: 74-82.
- Lindahl, U.; Hook, M.; Backstrom, G.; Jacobsson, I.; Riesenfeld, J.; Malmstrom, A.; Rodén, L.; Feingold, D. S. (1977) Structure and biosynthesis of heparin-like polysaccharides. **Fed. Proc.** **36**:19-23.
- Lindahl, U & Höök, M. (1978) Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. **Ann. Rev. Biochem.** **47**: 385-417.
- Lindahl, U., Backström, G.; Hook, M.; Thunberg, L.; Fransson, L. & Linker, A. (1979) Structure of the antithrombin-binding site in heparin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**, 3198-3202.
- Lindahl, U., Backstrom, G.; Thunberg, L. & Leder, I.G. (1980) Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**: 6551-6555.

- Lidholt, K., Kjellén, L., Lindahl, U. (1989) Biosynthesis of heparin. Relationship between the polymerization and sulphation processes. **Biochem J.** **261(3)**:999-1007.
- Linhardt, R. J., Cooney, C. L., Tapper, D., Zannetos, C. A., Larsen, A. K., Langer, R. (1984) An immobilized microbial heparinase for blood deheparinization. **Appl Biochem Biotechnol.** **9(1)**:41-55.
- Linhardt, R. J.; Merchant, Z.M. & Persinger, D.W. (1985) Immuno-affinity purification of heparinase. **Int. J. Biochem.** **17**: 1179-1183.
- Linker, A.; Meyer, K. & Hoffman, P. (1956) Production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. **J. Biol. Chem.** **235**: 924-927.
- Linker, A.; Hoffman, P.; Sampson, P. & Meyer, K. (1958) Heparan sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta** **29**: 443.
- Linker, A. & Sampson, P. (1960) The enzymic degradation of heparitin sulfate. **Biochem Biophys. Acta** **43**: 366-368.
- Linker, A.; Hoffman, P.; Meyer, K.; Sampson, P. & Korn, E.D. (1960) The formation of unsaturated disaccharides from mucopolysaccharides and their cleavage to α -keto acid by bacterial enzymes. **J. Biol. Chem.** **235**: 3061-3065.
- Linker, A. & Hovingh, P. (1965) The enzymatic degradation of heparin and heparitin sulfate. I. The fractionation of a crude heparinase from *flavobacteria*. **J. Biol. Chem.** **240**: 3724-3728.
- Linker, A. & Hovingh, P. (1972) Heparinase and heparitinase from flavobacteria. **Methods in Enzymology** **28**: 902-911.
- Liu, D.; Shriver, Z.; Godavarti, R.; Venkataraman, G. & Sasisekharan R. (1999) The calcium-binding sites of heparinase I from *Flavobacterium heparinum* are essential for enzymatic activity. **J. Biol. Chem.** **274**: 4089-4095.
- Liu, D.; Shriver, Z.; Qi, Y.; Venkataraman, G. & Sasisekharan R. (2002) Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. **Semin. Thromb. Hemostasis** **28**: 67-78.
- Lohmander, L. S.; De Lucca, S.; Nilsson, B.; Hascall, V. C.; Caputo, C. P.; Kimura, J. H. & Heinegard, D. (1980) Oligosaccharides on proteoglycans from the Swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem.** **255**: 6084-6091.
- Loohse, D. L. & Linhardt, R. (1992) Purification of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.** **267**: 24347-24355.

- Lopes-Lima, M.; Ribeiro, I.; Pinto, R. A. & Machado, J. (2005) Isolation, purification and characterization of glycosaminoglycans in the fluids of the mollusc *Anodonta cygnea*. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** **141**: 319-326.
- Lopes, C. C.; Dietrichi, C. P. & Nader, H. B. (2006) Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Braz J Med Biol Res.** **39**: 157-167.
- Lühn, S.; Schiemann, S. & Alban, S. (2011) Simple fluorescence assay for quantification of OSCS in heparin. **Anal. Bioanal. Chem.** **399**:673-680.
- Lyon, M. & Gallagher, J. T. (1998) Bio-specific sequences and domains in heperan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. **Matrix Biol.** **17**: 485-493.
- Maccarana, M.; Kalamajski, S.; Kongsgaard, M.; Magnusson, P.; Oldberg, A. & Malmstrom, A. (2009) Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and altered collagen structure in skin. **Molecular and Cellular Biology** **29**: 5517-5528.
- Malmström, A. & Fransson, L. A. (1971) Structure of pig skin dermatan sulfate. Demonstration of sulfated iduronic acid residues. **Eur. J. Biochem.** **18**: 431-435.
- Markowitz, C. D.; Gutnick, D. L. & Rosenberg, E. (1982) **Appl. Environ. Microbiol.** **46**: 573-579.
- Martins, J. R.; Passerotti, C. C.; Maciel, R. M.; Sampaio, L. O.; Dietrich, C. P. and Nader, H. B. (2003) Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. **Anal. Biochem.** **319 (1)**: 65-72.
- Martins, J. R.; Furlanetto R. P.; Oliveira, L. M.; Mendes, A.; Passerotti, C. C.; Chiamolera, M. I.; Rocha, A. J.; Manso, P. G.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. and Maciel, R. M. (2004) Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activities scores in patients with Graves' ophthalmopathy. **Clin Endocrinol**, **60**:726-33.
- Mathews, M. B. (1975). **Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics of Connective Tissue. Macromolar Structure and Evolution.** In: Kleinzeller, A.; Springer, G. K. & Wittman, H. G. (Eds). Springer-Verlag, New York, vol. 19, p.99, 104, 135, 175, 213.

- Maurel, P., and Douzou, P. (1975) Solvent-temperature perturbations of ionizable groups as a tool for the investigation of the active site of enzymes. **J. Biol. Chem.** **250**: 2678-2680.
- McLean, J. (1916). The thromboplastic action of cephalin. **American Journal of Physiology** **41**: 250-257.
- Medeiros, M.G.L. - **Caracterização do sistema enzimático envolvido na degradação seqüencial de heparam sulfato no molusco *Tagelus gibbus***. São Paulo, 1993 (Tese – Doutorado- Convênio UFRN/EPM).
- Medeiros, G.F.; Mendes, A.; Castro, R.A.B.; Baú, E.C.; Nader, H.B. & Dietrich, C.P. (2000) Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochim. Biophys. Acta** **1475**: 287-294.
- Merli, G. L.; Vanscoy, G. J.; Rihn, T. L.; Groce, J. B. & McCormick, W. (2001) Applying scientific criteria to therapeutic interchange: a balanced analysis of low-molecular-weight heparins. **J. Thromb. Thrombolysis.** **11**: 247-59.
- Meyer, K. H. and Schwartz, D. E. (1950). Les substituants des groups amino de l'heparine. Sur les polysaccharides aminés II. **Helvetica Chimica Acta** **33**: 1651.
- Michelacci, Y.M. & Dietrich, C.P. (1973) Isolation and partial characterization of a induced chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum*. **GIAM IV**, **1**: 69-77.
- Michelacci, Y.M. & Dietrich, C.P. (1974) Isolation and partial characterization of an individual chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **56**: 973-980.
- Michelacci, Y.M. & Dietrich, C.P. (1975) A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. Isolation of a chondroitinase AC susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulfate B. **Biochem. J.** **151**: 121-129.
- Michelacci, Y. M., & Dietrich, C. P. (1976) Structure of chondroitin sulfates. Analyses of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases A and AC from *Flavobacterium heparinum*. **Biochimica et Biophysica. Acta.**, **451(2)**: 436-443.
- Michelacci, Y. M.; Mourão, P. A. S.; Laredo, J. & Dietrich, C. P. (1979) Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. **Connect. Tiss. Res.** **7**: 29-36.

- Michelacci, Y. M., Laredo, J. & Dietrich, C. P. (1981) Proteoglycans and chondroitin sulfates from human multiple chondroma (enchondromatosis). **Braz. J. Med Biol. Res.** **14(2-3)**: 161-172.
- Michelacci, Y. M., & Dietrich, C. P. (1986) Structure of chondroitin sulfate from whale cartilage: distribution of 6- and 4-sulphated oligosaccharides in the polymer chains. **Int. J. Biol. Macromol.** **8**: 108-113.
- Michelacci, Y. M. & Horton, D. S. P. Q. (1989) Proteoglycans from the cartilage of young hammerhead shark *Sphyrna lewini*. **Comp. Biochem. Physiol.** **92b**: 651-658.
- Moreira, C. R.; Lopes, C. C.; Cuccovia, I. M.; Porcionatto, M. A.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B. (2004) Heparan sulfate and control of endothelial cell proliferation: increased synthesis during the S phase of the cell cycle and inhibition of thymidine incorporation induced by ortho-nitrophenyl-beta-D-xylose. **Biochim Biophys Acta.** **1673(3)**:178-85.
- Mourão, P. A. S.; Toledo, S. A. P.; Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1973) Excretion of chondroitin sulfate C with low sulfate content by patients with generalized platyspondyly (brachyolmia). **Biochem. Med.** **7**: 415-423.
- Mourão, P. A., Rozenfeld, S., Laredo, J., Dietrich, C. P. (1976) The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones. **Biochim Biophys Acta** **428(1)**:19-26.
- Mourão, P. A. S.; Michelacci, Y. M. & Toledo, O. M. S. (1979) Glycosaminoglycans and proteoglycans from normal and tumoral cartilages of human and rat. **Cancer Res.** **39**: 2802-2806.
- Muir, H. (1958). The nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulfate complex from hyaline cartilage. **Biochemical Journal** **69**: 195-204.
- Muir, H. & Hardingham, T. E (1975) **Structure of proteoglycans**. In: WHELAN, W.J. - **Biochemistry of carbohydrates**. (Biochemistry, series one - MTP International Review of Science) vol 5. Ed. Baltimore, University Park Press, p. 153-222.
- Myette, J. R.; Shriver, Z.; Kiziltepe, T.; McLean, M. W.; Venkataraman, G. & Sasisekharan, R. (2002) Molecular cloning of the heparin/heparan sulfate delta 4,5 unsaturated glycuronidase from *Flavobacterium heparinum*, its recombinant

- expression in *Escherichia coli*, and biochemical determination of its unique substrate specificity. **Biochemistry** **41**: 7424-7434.
- Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1974) Effect of heparitin sulfate fractions on coagulation and hemostasis. **Proc. Soc. Exptl. Biol Med** **146**: 504-508.
- Nader, H. B.; Takahashi, H. K.; Straus, A. H. & Dietrich, C. P. (1980) Selective distribution of the heparin in mammals: conspicuous presence of heparin in lymphoid tissues. **Biochim. Biophys. Acta** **627**: 40-8.
- Nader, H. B.; Medeiros, M. G. L.; Paiva, V. M. P.; Jerônimo, S. M. B.; Ferreira, T. M. P. C. & Dietrich, C. P. (1983) A correlation between the sulfated glycosaminoglycans concentration and degree of salinity of the "habitat" in fifteen species of the classes *Crustacea*, *Pelecypoda* and *Gastropoda*. **Comp. Biochem. Physiol.** **76**: 433-6.
- Nader, H. B.; Ferreira, T. M. P. C.; Paiva, J. F.; Medeiros, M. G. L.; Jerônimo, S. M. B.; Paiva, V. M. P. & Dietrich, C. P. (1984) Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of mollusks. **J. Biol. Chem.** **259**: 1431-1435.
- Nader, H. B.; Dietrich, C. P.; Buonasssi, V. & Colburn, P. (1987) Heparin sequences in heparan sulfate chain of an endothelial cell proteoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **84**: 3565-3569.
- Nader, H. B.; Ferreira, T. M. P. C.; Toma, L.; Chavante, S. F.; Dietrich, C. P.; Casu, B. & Torri, G. (1988) Maintenance of heparan sulfate structure through evolution: chemical, and enzymic degradation and ¹³C-N.M.R. spectral evidence. **Carbohydr. Res.** **184**: 292-300.
- Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1989) **Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications**, D.A. Lane, and U. Lindahl (Eds), Edward Arnold, London, 81.
- Nader, H. B.; Porcionatto, M. A.; Tersariol, I. L. S.; Pinhal, M. A. S; Oliveira, F. W.; Moraes, C. T. & Dietrich, C. P. (1990) Purification and substrate specificity to heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analysis of the heparin and heparan sulfate degradation products by ¹³C NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.** **265**: 16807-16813.
- Nader, H. B. (1991) Characterization of a heparan sulfate and peculiar chondroitin 4-sulfate from platelets. **J. Biol. Chem.** **266**: 10518-10523.

- Nader, H. B.; Medeiros, M. G. L.; Souza Filho, J. F.; Ferreira, T. M. P. C & Dietrich, C. P. (1993) The mode of action of sulfated glycosaminoglycans degrading enzymes in bacteria, invertebrates and vertebrates. **Ciência e Cultura**, **45**: 62-65.
- Nader, H. B.; Oliveira, F. W.; Jerônimo, S. M. B.; Chavante, S. F.; Sampaio, L. O. & Dietrich, C. P. (1996) Synchronized order of appearance of hyaluronis acid (or acidic galactan) chondroitin C-4/C-6 sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate and heparin during morphogenesis, differentiation and development. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **29**: 1221-6.
- Nader, H. B.; Chavante, S. F.; Santos, E. A; Oliveira, F. W.; Paiva, J. F.; Jerônimo, S. M. B.; Medeiros, G. F.; Abreu, L. R. D.; Leite, E. L.; Souza-Filho, J. F.; Castro, R. A. B.; Toma, L.; Tersariol, I. L. S.; Porcionatto, M. A. & Dietrich, C. P. (1999a) Heparan sulfate and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Braz. J. Med. Biol. Res.** **32**: 1-10.
- Nader, H. B.; Kobayashi, E. Y.; Chavante, S. F.; Tersariol, I. L. S.; Castro, R. A. B.; Shinjo, S. K.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B. & Dietrich, C. P. (1999b) New insights on the specificity of heparin and heparan sulfate lyases from *Flavobacterium heparinum* revealed by the use of synthetic derivatives of K5 polysaccharide from *E. coli* and 2-O-desulfated heparin. **Glycoconj. J.** **16**: 265-270.
- Nader, H. B.; Lopes, C. C.; Rocha, H. A. O.; Santos, E. A. A. & Dietrich, C. P. (2004) Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr. Pharm. Des.** **10**: 951-66.
- Nagasawa, K. & Inoue, Y. (1980) Desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates. **Methods Carbohydr. Chem.** **8**: 287-289.
- Nakajima, M.; Irimura, T. & Nicolson, G.L. (1988) Heparanases and tumor metastasis. **J. Cell. Biochem.** **36**: 157-167.
- Neufeld, E. F. & Muenzen, J. (1995) **The mucopolysaccharidoses**. In **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. CR Scriver, AC Beaudet, WS Sly, D Valle, eds. (New York, McGraw Hill Inc.), pp. 2465-2494,.
- Nilsson, B.; De Lucca, S & Lohmander, S. (1982) Structure of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycan monomer isolated from the Swarm rat chondrosarcoma. **J. Biol. Chem.** **257**: 10920-10927.

- Noble, S.; Peters, D. H. & Goa, K. L. (1995) Enoxaparin. A reappraisal of its pharmacology and clinical applications in the prevention and treatment of thromboembolic disease. **Drugs**. **49**: 388-410.
- Noble, S. & Spencer, C. M. (1998) Enoxaparin. A review of its clinical potential in the management of coronary artery disease. **Drugs**. **56**: 259-72.
- Nominé, G., Bucourt, R. and Bertin, D. (1961). Recherches sur l'héparine et la N-désulfohéparine. Études de structure. **Bulletin de la Société Chimique de France** **561**.
- Northrop, D. B. (1981) The expression of isotope effects on enzyme-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.** **50**: 103-131.
- Oegema, T. R. Jr., Kraft, E. L., Jourdian, G. W., Van Valen T. R. (1984) Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. **J Biol Chem.** **259(3)**:1720-6.
- Ofori, F. A. & Barrowcliffe, T. W. (1990) **Mechanism of action of low molecular weight heparins and heparinoids**. In: Hirsh, J., Ed. **Antithrombotic Therapy**. Bailliere's Clinical Haematology, vol. 3. London: Bailliere Tindall Ltd, 505.
- Oh, E. S. & Couchman, J. R. (2004) Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. **Molecular Cell**, **17**: 181-187.
- Oliveira, F. W.; Chavante, S. F.; Santos, E. A.; Dietrich, C. P. & Nader, H. B. (1994) Isolation and characterization of a galactanase, galactosidases, heparin sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes synthesized during embryonic development of the mollusk *Pomacea sp.* **Biochim. Biophys. Acta** **1200**: 240-246.
- Parish, C. R.; Freeman, C. & Hullet, M. D. (2001) Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. **Biochem. Biophys. Acta** **1471**: 99-108.
- Payza, A. N. & Korn, E. D. (1956) Bacterial degradation of heparin. **Nature** **177**: 88-89.
- Pazos, M. C., Nader, H. B. (2007) Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. **Braz J Med Biol Res.** **40(8)**:1025-35.
- Perlin, A. S., Mazurek, M., Jaques, L. B. & Kavanagh, L. W. (1968) A proton magnetic resonance spectral study of heparin. L-iduronic acid residues in commercial heparins. **Carbohydr Res.** **7**: 369.

- Perlin, A. S. & Sanderson, G. R. (1970) L-idurinic acid, a major constituent of heparin. **Carbohyd Res.** **12**: 183.
- Perlin, A. S.; Mackie, D. M. & Dietrich, C. P. (1971) Evidence for a (1→4)-linked 4-O-(α-L-idopyranosyluronic acid 2-sulfate)-(2-deoxy-2-sulfoamino-D-glucopyranosyl 6-sulfate) sequence in heparin. Long-range H-H coupling in 4-deoxy-hex-4-enopyranosides. **Carbohyd Res.** **18**: 185-194.
- Perlin, A. S.; Casu, B.; Sanderson, G.; Johnson, L. F. (1970). **Can. J. Chem.** **48**:2260-68.
- Perlin, A. S. (1975). In **Proc. Int. Symp. Macromol.**, ed. E.B. Mano, PP. 337-48 Amsterdam: Elsevier.
- Perrimon, N. & Bernfield, M. (2000) Specificities of heparan sulfate proteoglycans in developmental processes. **Nature** **404**: 725-728.
- Plaas, A. H. K.; Neame, P. J.; Nivens, C. M. & Reiss, L. (1990) Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. **J. Biol. Chem.** **265**: 20634-20640.
- Población, C. A.; Michelacci, Y. M. (1986) Structural differences of dermatan sulfates from different origins. **Carbohyd. Res.** **147**: 87-100.
- Porcionatto M; Moreira, C. R.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B. (1994) Heparan sulfate proteoglycan and control of cell proliferation: enhanced synthesis induced by phorbol ester (PMA) in early G1-S cell cycle transition. **Braz. J. Med.Biol. Res.** **27**: 2185-2190.
- Porcionatto M. **Aumento da síntese de heparam sulfato e bloqueio do ciclo celular induzidos pela ativação da proteína quinase C em células endoteliais.** São Paulo, 1996. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular). Universidade Federal de São Paulo. Brasil.
- Porcionatto M; Moreira, C. R.; Lotfi, C. R.; Armelin, H. A.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B. (1998) PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) stimulates the synthesis of heparan sulfate proteoglycan at G1 phase of the endothelial cell cycle: a possible correlation with PKC activation. **J. Cell Biochem.** **70**: 563-572.
- Razi, N. & Lindahl, U. (1995) Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. The D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase reaction: target and inhibitor saccharides. **J. Biol. Chem.**, **270**: 11267-11275.

- Rej, R. N., & Perlin, A. S. (1990) Base-catalysed conversion of the alpha-L-iduronic acid 2-sulfate unit of heparin into a unit of alpha-L-galacturonic acid and related reactions. **Carbohydr. Res.** **200**: 437-447.
- Robinson. H. C.; Horner, A. A.; Höök, M.; Ögren, S. & Lindahl, U. (1978) A proteoglycan form of heparin and its degradation to single-chain molecules. **J. Biol. Chem.**, **253**: 6687-93.
- Roberts, I. S. (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. **Annu. Rve. Microbiol.** **50**: 285-315.
- Róden, L. & Smith, R. (1966) Structure of neutral trisaccharide of the chondroitin 4-sulfate-protein complex of cartilage. **J. Biol. Chem.** **241**: 5949-5954.
- Róden, L. (1970) In **Metabolic conjugation and metabolic Hidrolysis**, ed. W. H. Fishman, 2:345-442. New York: Academic. 692 pp.
- Rodriguez, M. L.; Jann, B. & Jann, K. (1988) Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone. **Eur. J. Biochem.** **177**: 117-124.
- Rondle, C. J. M., & Morgan, W. T. J. (1955) The determination of glucosamine and galactosamine. **Biochem. J.** **61**: 586-589.
- Saigoh, K.; Izumikawa, T.; Koike, T.; Shimizu, J.; Kitagawa, H.; Kusunoki, S. (2010). Chondroitin beta-1,4-Nacetylglactosaminiltransferase-1 missense mutations are associated with neuropathies. **J Hum Genet** **56(2)**:143-6.
- Salmivirta, M.; Lidholt, K. & Lindahl, U. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J.*, **10**: 1270-79.
- Sampaio, L. O.; Dietrich, C. P. & Gianotti, F. O. (1977) Change in sulfated mucopolysaccharide, composition of mammalian tissues during growth and cancer tissue. **Biochem. Biophys. Acta** **498**: 123-131.
- Sampaio, L. O. & Nader, H. B. (2006) Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. **Adv. Pharmacol.** **53**: 233-51.
- Santos, E. A.; Rocha, L. R.; Pereira, N. M.; Andrade, G. P.; Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (2002) Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusc *Anomalocardia brasiliiana*. In situ characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. **Histochem. J.** **34**: 553-8.

- Santos, A. A.; Chiarini-Garcia, H.; Oliveira, K. R.; Machado, C. R. (2003) Development of different mast cell types in the opossum *Didelphis albiventris*. **Anat Embryol (Berl)**. **206(3)**:239-45.
- Santos, A. V.; Onofre, G. R.; Oliveira, D. M.; Machado, E. A.; Allodi, S. & Silva, L. C. (2006) Heparan sulfate is the main sulfated glycosaminoglycan species in internal organs of the male cockroach, *Periplaneta Americana*. **Micron**. **37 (1)**: 41-6.
- Sasisekharan, R.; Bulmer, M.; Moremen, K. W.; Cooney, C. L. & Langer, R. (1993) Cloning and expression of heparinase I gene from *Flavobacterium heparinum*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **90**: 3660-3664.
- Sasisekharan, R.; Moses, M. A. Nugent, M. A.; Cooney, C. L. & Langer, R. (1994) Heparinase inhibits neovascularization. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **91**: 1524-1528.
- Sasisekharan, R., Leckband, D., Godavarti, R., Venkataraman, G., Cooney, C. L. & Langer, R. (1995) Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*: the role of the cysteine residue in catalysis as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. **Biochemistry** **34**, 14441-14448.
- Sasisekharan, R., Venkataraman, G., Godavarti, R., Ernst, S., Cooney, C. L. & Langer, R. (1996) **J. Biol. Chem.** **271**: 3124-3131.
- Sasisekharan, R.; Shriver, Z.; Venkataraman, G. & Narayanasami, U. (2002) Roles of heparan sulphate glycosaminoglycans in cancer. **Nat. Rev. Cancer** **2**: 521-528.
- Scott, J. E. (1992) Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans in vitro and in the tissues. **FASEB J.** **6**: 2639-45.
- Seno, N. & Toda, N. (1970) The carbohydrate-peptide linkage region of keratan sulfate from whale cartilage. **Biochim Biophys Acta**. **215(3)**:544-6.
- Shaya, D.; Tocili, A.; Li, Y.; Myette, J.; Venkataraman, G.; Sasisekharan, R. & Cygler, M. (2006) Crystal structure of heparinase II from *Pedobacter heparinus* and its complex with a disaccharide product. **J. Biol. Chem.** **281**: 15525-15535.
- Shaya, D. Zhao, W.; Garron, M. L.; Xiao, Z.; Cui, Q.; Zhang, Z.; Sulea, T.; Linhardt, R. J. & Cygler, M. (2010) Catalytic mechanism of heparinase II investigated by site-directed mutagenesis and crystal structure with its substrate. **J. Biol. Chem.** **285**: 20051-20061.

- Silbert, J. E. & Reppucci, A. C. (1976) Biosynthesis of chondroitin sulfate. Independent addition of glucuronic acid and N-acetylgalactosamine to oligosaccharides. **J. Biol. Chem.** **251**: 3942-3947.
- Silva, M. E. & Dietrich, C. P. (1974) Isolation and partial characterization of three induced enzymes from *Flavobacterium heparinum* involved in the degradation of heparin and heparitin sulfates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **56**: 965-972.
- Silva, M. E.; Dietrich, C. P. (1975) The structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.** **250**: 6841-6846.
- Silva, M. E.; Dietrich, C. P. & Nader, H. B. (1976) On the structure of heparitin sulfates. Analyses of the products formed from heparitin sulfates by two heparitinases and heparinase from *Flavobacterium heparinum*. **Biochim. Biophys. Acta** **437**: 129-141.
- Simons, M. & Horowitz, A. (2001) Syndecan-4-mediated signalling. **Cell Signal.** **13(12)**:855-62.
- Souza Filho, J. F.; Medeiros, M. G. L.; Paiva, V. M. P., Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1985) Enzymatic degradation of glycosaminoglycans in mollusks: formation of glucuronic acid and N-acetyl-hexosamines from heparin sulfate and chondroitin sulfate by enzymes from three species of mollusks of the classes gastropoda and pelecypoda. **Comp. Biochem. Physiol.**, **82B**: 223-227.
- Spillman, D.; Thomas-Oates, J. E.; Van Kuik, J. A.; Vliegenthart, J. F. G.; Misevic, G.; Burger, M. M. & Finne, J. (1995) Characterization of a novel sulfated carbohydrate-mediated cell aggregation of the marine sponge *Microciona prolifera*. **J. Biol. Chem.** **270**: 5089-5097.
- Straus, A. H.; Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1982) Absence of heparin or heparin-like compounds in mast cell-free tissues and animals. **Biochem. Biophys. Acta** **717**: 478-85.
- Straus, A. H.; Nader, H. B.; Takahashi, H. P. & Dietrich, C. P. (1982) **An. Acad. Bras. Cienc.**, **54**: 439.
- Straus, A. H.; Sant'anna, O. A., Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1984) **Biochem. J.** **220**: 625.
- Su, H.; Blain, F.; Musil, R. A.; Zimmermann, J. J. F.; Gu, K. & Bennett, D. C. (1996) Isolation and expression in *Escherichia coli* of *hepB* and *hepC*, genes coding for

- the glycosaminoglycans-degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from *Flavobacterium heparinum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 2723-2734.
- Sugahara, K.; Yamashina, I.; De Waard, P.; Wan Halbeek, H. & Vliegenthart, J. F. G. (1988) Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-O-sulfate) β 1-4Gal β 1-O-Ser. **J. Biol. Chem.** **263**: 10168-10174,.
- Taylor, R. L.; Shively, J. E.; Conrad, H. E. & Cifonelli, J. A. (1973) Uronic composition of heparins and heparan sulfates. **Biochemistry** **12**: 3633-3637.
- Taylor, R. L., Shively, J. E., & Conrad, H. E. (1976) **Methods Carbohydr. Chem.** **7**: 149-151.
- Tersariol, I. L. S.; Ferreira, T. M. P.; Medeiros, M. G. L.; Porcionatto, M. A.; Moraes, C. T.; Abreu, L. R. D.; Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1994) Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans of different origins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **27**: 2097-2102.
- Theocharis, A., D.; Skandalis, S., S.; Tzanakakis, G., N. & Karamanos, N. K. (2010) Proteoglycans in healthy and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FEBS J.** **277**: 3904-3923.
- Thonar, E.J. & Sweet, M.B.E. (1977) An oligosaccharide component in proteoglycan of articular cartilage. **Biochim. Biophys. Acta** **584**: 353-357.
- Tilley, R. & Mackman, N. (2006) Tissue factor in hemostasis and thrombosis. **Semin. Thromb. Hemost.** **32**: 5-10.
- Tollefsen, D. M.; Majerus, D. W. & Blanck, M. K. (1982) Heparin cofactor II: purification and properties of thrombin in human plasma. **J. Biol Chem.** **257**: 2162-9.
- Tollefsen, D. M.; Pestka, C. A. & Monafó, W. J. (1983) Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. **J. Biol. Chem.** **258**: 6713-6.
- Toledo, O. M. S. & Dietrich, C. P. (1977) Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochem, Biophys. Acta** **498**: 114-22.
- Tone, Y.; Pedersen, L. C.; Yamamoto, T.; Izumikawa, T.; Kitagawa, H.; Nishihara, J.; Tamura, J.; Negishi, M.; Sugahara, K. (2008) 2-o-phosphorylation of xylose and

- 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. **J. Biol. Chem.** **283(24)**:16801-7.
- Trevelyan, W.E.; Procter, D.P. & Harrison, J.S. (1950) Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature** **166**: 444-445.
- Turnbull, J.E. & Gallagher, J.T. (1990) Molecular organization of heparan sulphate from human skin fibroblasts. **Biochem. J.** **265**: 715-724.
- Ueno, M.; Yamada, S.; Zako, M.; Bernfield, M.; Sugahara K. (2001) Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. **J. Biol. Chem.** **276(31)**:29134-40.
- Van Boeckel, C. A. A., Van Aelst, S. F.; Wagenaars, G. N., Mellema, J. R., Paulsen, H., Peters, T., Pollex, A., and Sinnwell (1987) **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas** **106**, 19-28
- Vann, W. F.; Schmidt, M. A.; Jann, B. & Jann, K. (1981) The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* 010:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. **Eur. J. Biochem.** **116**: 359-364.
- Versteeg, H. H. & Ruf, W. (2006) Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. **Semin. Thromb. Hemost.** **32**: 24-32.
- Vlodavsky, I.; Mohsen, M.; Lider, O.; Svahn, C.M.; Ekre, H.P.; Vigoda, M.; Ishai-Michaeli, R. & Peretz, T. (1994) Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. **Invasion Metastasis** **14**: 290-302.
- Vlodavsky, I.; Friedmann, Y.; Elkin, M.; Aingom, H.; Atzmon, R.; Ishai-Michaeli, R.; Bitan, M.; Pappo, O.; Peretz, T.; Micha, I.; Spector, L. & Pecker, I. (1999) Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. **Nat. Med.** **5**: 793-802.
- Wilson, J. C.; Hitchen, P. G.; Frank, M.; Peak, I. R.; Collins, P. M.; Morris, H. R.; Dell, A. & Grice, I. D. (2005) Identification of a capsular polysaccharide from *Moraxella bovis*. **Carbohydr. Res.** **340**: 765-769.
- Wolfrom, M. L. & McNeely, W. H. (1945). The relation between the structure of heparin and its anticoagulant activity. **Journal of the American Chemical Society** **67**: 748-753.

- Wolfrom, M. L., Montgomery, R.; Karabinos, J. V. and Rathgeb, P. (1950). The structure of heparin. **J. Am. Chem. Soc.** **72**: 5796.
- Xiao, Z.; Tappen, B. R.; Ly, M.; Zhao, W.; Canova, L. P.; Guan, H. & Linhardt, R. J. (2010) Heparin mapping using heparin lyases and the generation of a novel low molecular weight heparin. **J. Med. Chem.** **54**: 603-10.
- Xiao, Z.; Zhao, W.; Yang, B.; Zhang, Z.; Guan, H. & Linhardt, R. J. (2011) Heparinase 1 selectivity for the 3,6-di-O-sulfo-2-deoxy-2-sulfamido- α -D-glucopyranose (1,4) 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic acid (GlcNS3S6S-IdoA2S) linkages. **Glycobiol.** **21**: 13-22.
- Yamagata, T.; Saito, H.; Habushi, O. & Suzuki, S. (1968) Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **J. Biol. Chem.** **243**: 1523-1535.
- Yanagishita, M. & Hascall, V. C. (1984) Proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture: isolation, fractionation and characterization of proteoglycans associated with the cell layer. **J. Biol. Chem.** **249**: 10260-10269.
- Yang, V. C.; Linhardt, R. J.; Bernstein, H; Cooney, C. L. & Langer, R. (1985) Purification and characterization of heparinase from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.** **260**: 1849-1857.
- Yoshida, E.; Arakawa, S.; Matsunaga, T.; Toriumi, S.; Tokuyama, S.; Morikawa, K. & Tahara, Y. (2002) Cloning, sequencing and expression of the gene from *Bacillus circulans* that codes for a heparinase that degrades both heparin and heparan sulfate. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** **66**: 1873-1879.
- Yu, G.; LeBrun, L.; Gunay, N. S.; Hoppensteadt, D.; Walenga, J. M.; Fareed, J. & Linhardt, R. J. (2000) Heparinase I acts on a synthetic heparin pentasaccharide corresponding to the antithrombin III binding site. **Thromb. Res.** **100**: 549-556.
- Zeltz, C.; Brézillon, S.; Käpylä, J.; Eble, J. A.; Bobichon, H.; Terryn, C.; Perreau, C.; Franz, C. M.; Heino, J.; Maquart, F. X. & Wegrowski, Y. (2010) Lumican inhibits cell migration through $\alpha 2\beta 1$ integrin. **Exp. Cell Res.** **316**(17): 2922-31.
- Zucker, M. B. & Borelli, J. (1958) A survey of some platelet enzymes and functions, the platelets as the source of normal serum acid glycerophosphatase. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **75**: 203-13.

CAROLINA RIBEIRO CÓRDULA

CURRICULUM

São Paulo

2011

I. DADOS PESSOAIS:

Nome: Carolina Ribeiro Córdula

Nome em citações bibliográficas: CÓRDULA, Carolina Ribeiro

Sexo: Feminino

Filiação: Raul Córdula Filho e Diana Carolina de Assis Ribeiro

Nascimento: 07/03/1981 – João Pessoa/PB – Brasil

Carteira de identidade: 54.470.246-3 SSP-SP - 16/08/2010

CPF: 041.372.504-99

Endereço Profissional

Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica

Rua 3 de maio, 100, depto Bioquímica, disciplina de Biologia Molecular

Vila Clementino - São Paulo

04044-020, SP - Brasil

Telefone: 11 55764438

URL da home page: <http://www.unifesp.br>

Endereço eletrônico: carolcordula@hotmail.com

II. Formação Acadêmica/Titulação

2000 - 2004	Graduação em Ciências Biomédicas Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Viabilização de Levana como Suporte para Imobilização de Gentamicina Orientador: Maria da Paz Carvalho da Silva Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2004 - 2006	Mestrado em Bioquímica/ Biologia Molecular Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil Título: Estudo de Indução das Endoglicosidases de <i>Flavobacterium heparinum</i> . Clonagem da Heparinase III. Orientador: Leny Toma Co-orientador: Helena Bonciani Nader

	<p>Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</p> <p><i>Palavras-chave: Heparitinase I, enzima, Biologia molecular</i></p> <p><i>Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular, Enzimologia</i></p>
2006	<p>Doutorado em Bioquímica/ Biologia Molecular</p> <p>Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil</p> <p>Título: Clonagem, expressão, mutação e estudo cinético de Heparinase de <i>Flavobacterium heparinum</i>.</p> <p>Orientador: Helena Bonciani Nader</p> <p>Co-orientador: Ivarne Luis dos Santos Tersariol</p> <p>Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</p> <p><i>Palavras-chave: heparinase, heparina</i></p> <p><i>Áreas do conhecimento: Bioquímica, Enzimologia, Biologia Molecular</i></p>

III. Áreas de Atuação:

1. Bioquímica, Química de Macromoléculas, Glicídeos
2. Bioquímica, Biologia Molecular
3. Ciências Biológicas, Bioquímica
4. Bioquímica, Enzimologia

IV. Idiomas:

Inglês: Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Francês: Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Espanhol: Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Português: Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

V. Produção Bibliográfica

1.1. Artigos completos publicados em periódicos

- Lima, Marcelo A, Rudd, Timothy R, Farias, Eduardo H. C., Ebner, Lyvia F, Ferreira, T. G., Souza, Lauro M, Mendes, A., Córdula, Carolina Ribeiro, Martins, João R. M., Hoppensteadt, D., Fareed, J., Sasaki, G.L., Yates, E.A., Tersariol, I. L. S., Nader, H.B.

A new approach for heparin standardization: combination of scanning UV spectroscopy, nuclear magnetic resonance and principal component analysis. Plos One., v.6, p.e15970, 2011.

Palavras-chave: heparin, purity, principal component analysis, scanning UV spectroscopy, nuclear magnetic resonance.

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Probabilidade e Estatística

Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page: [http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015970].

- Araújo, P., Oliveira, G., Córdula, C.R., Leite, E.L., Carvalho Jr. L.B., Silva M.P.C.

Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Braz. J. Biol. Med Res., v.37, p.301 - 305, 2004.

Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso.

1.1.2. Resumos simples em anais de eventos:

- Córdula, C.R., Shinjo S.K., Kobayashi, E.Y., Dietrich, C. P. V., Nader, H.B., Tersariol, I. L. S.
Cloning, Expression and Kinetics Parameters of Heparinase I.
In: XL Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu, PR.
- Cahú, T., Santos, S.D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S.F., L.B. Carvalho Jr., Nader, H.B., Bezerra, R.S.
A Process to Full Utilization of the Shrimp Processing Waste to Recovery Bioactive Molecules by Autolysis
In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, PR.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários
- Córdula, C.R., Shinjo S.K., Kobayashi, E.Y., Dietrich, C. P. V., Nader, H.B., Tersariol, I. L. S.
Involvement of a Deprotonated Histidine and a Protonated Tyrosin on Heparinase I Catalysis.
In: XXXIX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, PR.
Palavras-chave: heparina, heparinase, enzima.
Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular, Enzimologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso.
- Córdula, C.R., Cahú, T.B., Kobayashi, E.Y., Bezerra, R.S., Toma, L., Nader, H.B.
Immobilization of Native and Recombinant Heparitinase I from Flavobacterium heparinum on Chitosan Beads
In: 6th International Conference on Proteoglycans, 2009, Aix-les-Bains - FR.
Palavras-chave: Heparitinase I, chitosan, immobilization
Áreas do conhecimento : Bioquímica
Referências adicionais : França/Inglês. Meio de divulgação: Impresso
- Córdula, C.R., Dreyfuss, J. L., Mendes, A., Toma, L., Porcionatto, M.,

Nader, H.B.

Update in Molecular Biology for Teachers from Public Schools: a Knowledge Exchange Experience

In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia - SP.

Áreas do conhecimento : Educação,Bioquímica

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Objetivos: Compartilhar os conhecimentos relacionados à biologia molecular com professores do ensino fundamental e médio; Promover uma ação multiplicadora junto aos alunos do ensino fundamental e médio; Divulgar a ciência e despertar nos jovens à curiosidade científica.

- Córdula, C. R., Ferreira, T.G., Kobayashi, E.Y., Pinhal, M.A.S., Toma, L., Nader, H.B.

Expression and Purification of recombinant heparinase III in Escherichia coli. Comparison with Heparitinase I purified from Flavobacterium heparinum

In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and Xi Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia.

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular,Enzimologia

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

- Rotger, T. S. R., Córdula, C.R., Dietrich, C. P. V., Pinhal, M.A.S., Tersariol, I. L. S., Toma, L., Nader, H.B.

Expression, Purification and Enzymatic Activity of recombinant Heparinase cloned from Flavobacterium heparinum.

- In: XXXVI Reunião Anual da SBBq, 2007, Salvador.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C. R., Ferreira, T.G., Kobayashi, E.Y., Toma, L., Nader, H.B.
Heparinase III from Flavobacterium heparinum: molecular cloning and sequencing

In: 5th International Conference on Proteoglycans, 2007, Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Heparinase III

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C. R., Ferreira, T.G., Kobayashi, E.Y., Pinhal, M.A.S., Toma, L.,

Nader, H.B.

Molecular Cloning and Sequencing of Heparinase III from *Flavobacterium heparinum*.

In: XXXVI Reunião Anual da SBBq, 2007, Salvador.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C. R., Ferreira, T.G., Kobayashi, E.Y., Pinhal, M.A.S., Toma, L., Nader, H.B.

Biochemical and molecular characterization of heparinase III formerly known as heparitinase I from F. heparinum.

In: XXXV Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular- SBBq, 2006, águas de Lindóia.

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários

- Córdula, C. R., Santos, D. M. S.; Calazans, G. M. T.; Silva, M. P. C
Characterization and Quantification of Gentamicin Immobilized on Levan. In:
XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia
Molecular - SBBq, 2004, Caxambu-MG.

Áreas do conhecimento : Glicídeos

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

- CÓRDULA, Carolina Ribeiro

Estudo das atividades farmacológicas da levana e sua utilização como suporte para imobilização de antibióticos

In: IV Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão, XI Congresso de Iniciação Científica, Conic, 2004, Recife.

Áreas do conhecimento : Glicídeos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C.R., Barros, Y. V. R. ; Calazans, G. M. T. ; Silva, M. P. C.
Imobilização de gentamicina em levana e sua caracterização microbiológica.

In: Reunião da Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003, Curitiba - PR.

Áreas do conhecimento : Glicídeos

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C.R., Barros, Y. V. R. ; Calazans, G. M. T. ; Silva, M. P. C.
The use of levan as support for gentamicin immobilization

In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu - MG.

Áreas do conhecimento : Glicídeos

Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C. R.

Imobilização de Antibiótico em Levana.

In: III Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão - X Congresso de Iniciação Científica -CONIC, 2002, Recife.

Áreas do conhecimento : Glicídeos

Setores de atividade : Produtos e Processos Biotecnológicos Vinculados À Saúde Humana Ou dos Animais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

- Córdula, C. R.

Extração e identificação de fosfolípídeo e colesterol

In: II Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão - II Congresso de Graduação - CONGRAD, 2001, Recife.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

VI. Cursos e Oficinas ministradas:

CÓRDULA, Carolina Ribeiro.

Técnicas de Clonagem, 2010 (curso de atualização em biologia molecular)

Instituição: Centro de Genomas

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais: Brasil/Português. 3 dias (12 horas). Meio de divulgação: Vários.

Público alvo: profissionais das áreas biológicas.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., Nader, H.B.

Ferramentas de Ensino em Ciências: O computador como instrumento na aula de Biologia, 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado).

Intituição: UNIVERSIDADE Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) como parte da Reunião Regional da SBPC em Mossoró

Palavras-chave: Biologia molecular, educação, professores

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. 3 dias. Meio de divulgação: Vários.

Público alvo: professores da rede pública do ensino fundamental e médio da região de Mossoró.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., Aquino, R.

O computador como instrumento na aula de Biologia, 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado).

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) como parte da 62ª Reunião Nacional da SBPC em Natal

Palavras-chave: Atualização, Biologia molecular, educação, professores

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Genética, Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. 8 horas. Meio de divulgação: Vários.

Público alvo: professores da rede pública do ensino fundamental e médio.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., Sallai, R.C., Nader, H.B.

Oficina: Vivenciando a Biologia 3a edição, 2010. (Curso de curta duração ministrado).

Instituição: UNIVERSIDADE Estadual do Rio Grande do Norte (UERN) como parte da Reunião Regional da SBPC em Mossoró

Palavras-chave: Biologia molecular, educação

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais: Brasil/Português. 8 horas. Meio de divulgação: Vários

A oficina “Vivenciando a Biologia” idealizada para a SBPC Mirim em Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, teve como tema “O fluxo da Informação Gênica”, estando voltada para as práticas de estrutura e extração de DNA e de proteínas, como também para visualização e identificação de células vegetais e animais. A SBPC Mirim aconteceu de 14 a 16 de abril de 2010, na

Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), como parte da Reunião Regional da SBPC em Mossoró, cujo tema foi “Água e Desenvolvimento no Semiárido”, e recebeu alunos da rede pública de ensino de Mossoró.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., Sallai, R.C., MEDEIROS, V. P., Aquino, R., Nader, H.B.

Oficina: **Vivenciando a Biologia 4a edição**, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) como parte da 62ª Reunião Nacional da SBPC em Natal

Palavras-chave: Atualização, Biologia molecular, educação

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais: Brasil/Português. 4 dias. Meio de divulgação: Vários

A oficina “Vivenciando a Biologia” idealizada para a SBPC Jovem em Natal, no estado do Rio Grande do Norte, teve como tema “O fluxo da Informação Gênica”, estando voltada para as práticas de estrutura e extração de DNA e de proteínas, como também para visualização e identificação de células vegetais e animais.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, Aquino, R., GAMERO, E. J. P., Kobayashi, E.Y., MENDES, A., Porcionatto, M., Sallai, R.C., VICENTE, C. M., Nader, H.B.

VI CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM CIÊNCIAS PARA PROFESSORES DO ENSINO FUNDAMENTAL E MÉDIO, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado).

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Palavras-chave: Atualização, Biologia molecular, educação, professores

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais: Brasil/Português. 40 horas. Meio de divulgação: Vários

O curso tem como tema “O fluxo da Informação gênica”. São oferecidas vagas aos professores de Biologia do Ensino Fundamental e Médio que atuam na rede Pública e Privada de Ensino do Estado de São Paulo. A estrutura é composta por dois módulos (teórico e prático), ministrados no Campus São

Paulo – UNIFESP. Após a conclusão desses módulos, os professores realizam trabalhos em suas respectivas escolas, e retornam após 3 meses para apresentação dos projetos realizados e avaliação crítica dos resultados obtidos. Aos professores que concluem todas as atividades é entregue um certificado expedido pela Pró-Reitoria de Extensão da UNIFESP (PROEX).

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., DREYFUSS, J. L., Sallai, R.C., Porcionatto, M., Nader, H.B.

Oficina: **Vivenciando a Biologia 2a edição**, 2009. (Curso de curta duração ministrado)

Instituição: Universidade Federal do Amazonas (UFAM) como parte da 61ª Reunião Nacional da SBPC

Palavras-chave: educação, Biologia molecular

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular

Setores de atividade : Educação

Referências adicionais : Brasil/Português. 18 horas

A SBPC Jovem aconteceu na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, de 13 a 17 de julho de 2009, como parte da 61ª Reunião Anual da SBPC, em Manaus, cujo tema foi “Amazônia: Ciência e Cultura”, e recebeu alunos da rede pública e particular de ensino de Manaus. A oficina “Vivenciando a Biologia” idealizada para a SBPC Jovem teve como tema “O fluxo da Informação Gênica”, estando voltada para as práticas de estrutura e extração de DNA e de proteínas, como também para visualização e identificação de células vegetais e animais.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., DREYFUSS, J. L., Sallai, R.C., Porcionatto, M., Nader, H.B.

Oficina: **Vivenciando a Biologia 1a edição**, 2009. (Curso de curta duração ministrado)

Instituição: Escola Estadual Pedro Teixeira, como parte da Reunião Regional da SBPC Regional em Tabatinga

Palavras-chave: Biologia molecular, educação

Áreas do conhecimento: Biologia Molecular

Setores de atividade : Educação

Referências adicionais : Brasil/Português. 18 horas.

A SBPC Mirim aconteceu de 17 a 20 de março de 2009, na Escola Estadual Pedro Teixeira, como parte da Reunião Regional da SBPC em Tabatinga, cujo tema foi “Conhecimento na Fronteira”, e recebeu alunos de Tabatinga e das cidades vizinhas, como Benjamin Constant e Letícia, na Colômbia. Participaram também alunos indígenas da comunidade Ticuna, proporcionando uma rica troca de ciência e cultura. A oficina "Vivenciando a Biologia" idealizada para a SBPC Mirim teve como objetivo divulgar e desmistificar, de forma lúdica, os mistérios das estruturas básicas que compõem os seres vivos e também abordar temas como nutrição e meio ambiente.

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., ACCARDO, C. M., CUNHA, G. L. A., DREYFUSS, J. L., GAMERO, E. J. P., Kobayashi, E.Y., Toma, L., Porcionatto, M., Nader, H.B.

V Curso de Atualização em Ciências para Professores do Ensino Fundamental e Médio, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Palavras-chave: Atualização, Biologia molecular, professores

Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Bioquímica

Setores de atividade : Educação

Referências adicionais : Brasil/Português. 40 horas. Meio de divulgação: Vários

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, MENDES, A., ACCARDO, C. M., ARIZA, C., VICENTE, C. M., REBOUCAS, C., ORIGOSSO, C. S. T., PAULA, C. A. A., GAMERO, E. J. P., NASCIMENTO, F. D., CUNHA, G. L. A., CAVALHEIRO, R. P., JORGE, R. C., FERREIRA, T. G., Nader, H.B., JARROUGE, T. R.

VI Curso de Atualização para Professores do Ensino Médio, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Referências adicionais : Brasil/Português. 40 horas. Meio de divulgação: Vários

VII. Produção Técnica

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, Aquino, R., Kobayashi, E.Y., MENDES, A., Sallai, R.C., VICENTE, C. M., ACCARDO, C. M.

VI Curso de Atualização para Professores do Ensino Médio, 2010.
(Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Palavras-chave: Atualização, Biologia molecular, educação

Áreas do conhecimento: Bioquímica, Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, ARIZA, C., CAVALHEIRO, R. P., CUNHA, G. L. A., Kobayashi, E.Y., MENDES, A., MEDEIROS, V. P., ACCARDO, C. M., Porcionatto, M., REBOUCAS, C., Sallai, R.C., VICENTE, C. M.

V Curso de Atualização para Professores do Ensino Médio, 2009.
(Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

CÓRDULA, Carolina Ribeiro, ACCARDO, C. M., ARIZA, C., CAVALHEIRO, R. P., FERREIRA, T. G., JORGE, R. C., REBOUCAS, C., VICENTE, C. M.
IV Curso de Atualização para Professores do Ensino Médio, 2008.
(Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

VIII. Orientações e Supervisões

Daniel Menezes Silvestre. Expressão e Purificação de heparin liases recombinantes de *Flavobacterium heparinum*. 2010. Iniciação científica (Química) - Universidade de São Paulo

Palavras-chave: Heparitinase I, heparam sulfato, purificação, enzima

Áreas do conhecimento: Bioquímica

Referências adicionais: Brasil/Português.

Co-orientação de aluno de iniciação científica com bolsa do programa PIBIC do CNPq. Orientador: Helena bonciani Nader Co-orientador: Carolina Ribeiro Córdula

XI. Participação em bancas de trabalhos de conclusão:

Graduação:

MIRANDA, T. A., BOUCAS, R. I., BOUCAS, T. R. J., CÓRDULA, C. R.,
TERSARIOL, I. L. S., Nader, H.B.

Participação em banca de Thaís Aguilar Miranda. Marcação do drogas
heparinômiméticas e suas interações em células endoteliais em cultura, 2009
(Ciências Biológicas) Universidade de Santo Amaro

Palavras-chave: heparina, heparinase, glicosaminoglicanos

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Referências adicionais : Brasil/Português.